

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
25 janvier 2001 (25.01.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 01/05422 A2

(51) Classification internationale des brevets⁷: A61K 38/17

(21) Numéro de la demande internationale:
PCT/FR00/02057

(22) Date de dépôt international: 17 juillet 2000 (17.07.2000)

(25) Langue de dépôt: français

(26) Langue de publication: français

(30) Données relatives à la priorité:
99/09372 15 juillet 1999 (15.07.1999) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US):
BIOMERIEUX STELHYS [FR/FR]; Chemin de
L'Orme, F-69280 Marcy L'Etoile (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement): ROECK-
LIN, Dominique [FR/FR]; 14 Rue de la Paix, F-67500
Niederschaeffolsheim (FR). KOLBE, Hanno [FR/FR]; 6

Rue des Tuiliers, F-67204 Achenheim (FR). CHARLES,
Marie-Hélène [FR/FR]; 3 Allée de la Lamperte, F-69420
Condrieu (FR). MALCUS, Carine [FR/FR]; 9 Rue des
Ronzières, F-69530 Brignais (FR). SANTORO, Lyse
[FR/FR]; 47 Avenue Bergeron, F-69260 Charbonnières les
Bains (FR). PERRON, Hervé [FR/FR]; 15 Rue de Boyer,
F-69005 Lyon (FR).

(74) Mandataire: DIDIER, Mireille; Cabinet Germain et
Maureau, Boîte Postale 6153, F-69466 Lyon Cedex 06
(FR).

(81) États désignés (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE,
DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NO,
NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) États désignés (régional): brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: USE OF A POLYPEPTIDE FOR DETECTING, PREVENTING OR TREATING A PATHOLOGICAL CONDITION
ASSOCIATED WITH A DEGENERATIVE, NEUROLOGICAL OR AUTOIMMUNE DISEASE

(54) Titre: UTILISATION D'UN POLYPEPTIQUE POUR DETECTER, PREVENIR OU TRAITER UN ETAT PATHOLOGIQUE
ASSOCIE A UNE MALADIE DEGENERATIVE, NEUROLOGIQUE AUTOIMMUNE

(57) Abstract: The invention concerns the use of at least one polypeptide comprising a protein fragment to obtain a diagnostic, prognostic, prophylactic or therapeutic composition for detecting, preventing or treating a pathological condition associated with a degenerative and/or neurological and/or autoimmune disease, said protein being selected among the proteins whereof the peptide sequence in native state corresponds to SEQ ID No 1, SEQ ID No 2, SEQ ID No 3, SEQ ID No 4, SEQ ID No 5, SEQ ID No 6, SEQ ID No 7, SEQ ID No 8, SEQ ID No 9, SEQ ID No 10, SEQ ID No 11, SEQ ID No 12, SEQ ID No 13, SEQ ID No 14, SEQ ID No 15, SEQ ID No 16, SEQ ID No 17, SEQ ID No 18, SEQ ID No 19, SEQ ID No 20, SEQ ID No 21, SEQ ID No 22, SEQ ID No 23, SEQ ID No 24, SEQ ID No 25, SEQ ID No 26, SEQ ID No 27, SEQ ID No 28 and SEQ ID No 29, and the peptide sequences having at least 70 % identity, preferably at least 80 % identity and advantageously at least 98 % identity with any one of the peptide sequences SEQ ID No 1 to SEQ ID No 8 and SEQ ID No 10 to SEQ ID No 29, and the peptide sequences or fragments of said sequences belonging to a common family of proteins selected among perlecan, the precursor of the retinol-binding plasmatc protein, of the precursor of the activator of GM2 ganglioside, of calgranulin B and of saponin B.

(57) Abrégé: Utilisation d'au moins un polypeptide comprenant au moins un fragment d'une protéine pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29, et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à SEQ ID N° 8 et SEQ ID N° 10 à SEQ ID N° 29, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B.

WO 01/05422 A2



MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

Publiée:

- *Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.*

**UTILISATION DUN POLYPEPTIDE POUR DETECTER, PREVENIR OU
TRAITER UN ETAT PATHOLOGIQUE ASSOCIE A UNE MALADIE
DEGENERATIVE, NEUROLOGIQUE AUTOIMMUNE**

5 La présente invention concerne notamment l'utilisation d'au moins un polypeptide, pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou auto-immune et/ou neurologique.

 Selon l'invention, on entend par maladie dégénérative, une maladie dans
10 laquelle un processus de mort cellulaire ou de destruction cellulaire est associé à des troubles physiologiques et/ou cliniques. La maladie d'Alzheimer, la sclérose latérale amyotrophique, la maladie de Parkinson sont classées parmi les maladies neurodégénératives. On entend par maladie auto-immune, une hyperréactivité du système immunitaire vis à vis d'un ou de plusieurs auto-antigène(s). La sclérose en
15 plaques (SEP), la polyarthrite rhumatoïde (PR) et le lupus érythémateux sont classés dans les maladies auto-immunes.

 La sclérose en plaques est une maladie chronique du système nerveux central de l'homme, évoluant par succession de phases de rémission et de poussée ou selon une progression régulière, dont la caractéristique anatomopathologique consiste
20 en la formation de zones de démyélinisation bien délimitées dans la substance blanche du cerveau et de la moelle épinière.

 Au niveau histologique, ces zones présentent au stade précoce du processus lésionnel, une dégradation de la myéline péri-axonale associée à une atteinte des cellules gliales responsable de cette démyélinisation. Une activation
25 macrophagique inflammatoire impliquant les cellules microgliales (macrophages tissulaires résidants du système nerveux central), ainsi que, probablement, des macrophages provenant de monocytes sanguins infiltrés, est associée à ce processus de démyélinisation et contribue à la destruction des feuillets myélinisés. Au centre de la zone démyélinisée, une déplétion relative en cellules gliales est retrouvée alors qu'une
30 prolifération d'astrocytes se développe à la périphérie et peut envahir la plaque démyélinisée pour générer une plaque fibreuse ou gliotique. Ces structures sclérotiques sont à l'origine du nom donné à la maladie.

Une autre caractéristique de ces plaques est leur association quasi systématique avec un élément vasculaire autour duquel elles se développent.

Au niveau histologique, on observe une altération fréquente de la barrière hémato-encéphalique (BHE) constituée par l'endothélium capillaire. Un des éléments
5 déterminants dans le maintien de la BHE est constitué par la présence sous-jacente d'extensions cytoplasmiques des astrocytes, appelées pieds astrocytaires. Vraisemblablement, les pieds astrocytaires induisent la formation ou permettent le maintien de structures de jonction étanches qui assurent la cohésion de la barrière endothéliale capillaire concrétisant la BHE. Or, différents modèles pathologiques font
10 état de l'altération de la BHE et d'une déplétion des pieds astrocytaires.

Par ailleurs, dans le processus lésionnel de la SEP, l'altération de la BHE contribue à amplifier la réponse inflammatoire associée, par l'afflux de cellules lymphoïdes provenant de la circulation sanguine. La contribution de l'inflammation associée aux cellules immunitaires est importante dans la SEP et participe au processus
15 lésionnel.

L'étiologie de la SEP est source d'un débat d'actualité car la maladie pourrait avoir des origines diverses. Des hypothèses ont été émises sur une origine bactérienne et/ou virale. Par ailleurs, comme décrit dans la demande de brevet WO 95/21859, H. Perron et al. ont été conduits à rechercher un ou des agents effecteurs
20 du processus pathogénique aboutissant à la formation typique de plaques de démyélinisation et à une gliose astrocytaire. Dans le cadre de cette étude, ils ont mis en évidence la présence dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) et le sérum de patients SEP d'au moins un facteur qui présente une activité toxique vis à vis des cellules astrocytaires et oligodendrocytaires humaines ou animales. Cette activité toxique se
25 caractérise par une désorganisation cytomorphologique du réseau de filaments intermédiaires et/ou une dégradation des protéines desdits filaments et/ou une mort cellulaires par apoptose des cellules gliales. Ils ont établi une corrélation significative entre la détection *in vitro* de cette activité toxique dans des échantillons de LCR et de sérum de patients SEP et la sclérose en plaques par un dosage colorimétrique
30 quantitatif au bromure de méthyltétrazolium (MTT) des cellules vivantes, comme décrit dans la demande de brevet WO 95/21859. Par ailleurs, C. Malcus-Vocanson *et al.* ont montré que l'urine est un fluide biologique très favorable pour la détection de

l'activité de ce facteur toxique et développé un procédé utilisant la cytométrie de flux pour détecter et/ou quantifier les cellules gliales adhérentes mortes par apoptose. Toutes les informations concernant ce procédé sont décrites dans la demande de brevet WO 98/11439, dont le contenu est incorporé à titre de référence.

5 Des essais ont été réalisés à partir d'une fraction protéique de LCR et d'urine de patients SEP pour tenter d'identifier ce facteur toxique. Le contenu protéique de chaque fraction a été séparé sur gel SDS-PAGE 12 % et observé après coloration du gel à l'argent. Parmi les protéines observées, une fraction protéique centrée sur un poids moléculaire apparent d'environ 21 kD a été trouvée
10 minoritairement associée à l'activité toxique détectée *in vitro* et une fraction centrée sur un poids moléculaire apparent d'environ 17 kD a été trouvée majoritairement associée à cette activité toxique.

Une injection de la fraction provenant de LCR de patients SEP dans le cerveau de rat Lewis et une observation histologique post-mortem de coupes de
15 cerveau des rats a permis d'observer, trois mois après l'injection, une apoptose de la population astrocytaire et la formation de plaques de démyélinisation. Toutes les informations sont contenues dans la demande de brevet WO 97/33466, dont le contenu est incorporé à titre de référence. Ces observations sont conformes à celles qui ont pu être faites sur des coupes de cerveau de patients atteints de SEP, après biopsie (N.
20 Benjelloun et al. Cell. Mol. Biol., 1998, 44 (4), 579-583).

Les présents inventeurs ont maintenant identifié et analysé les protéines associées à cette activité toxique vis à vis des cellules gliales dans des échantillons biologiques de patients SEP, en particulier dans l'urine, le liquide céphalo-rachidien et le sérum.

25 Après purification des protéines et séparation sur gel SDS-TRICINE, les inventeurs ont mis en évidence la présence de quatre bandes d'intérêt de différents poids moléculaires apparents, respectivement de 8, 14, 18 et 20 kD correspondant à au moins cinq familles de protéines différentes. Les protéines de ces familles ont ensuite été analysées par spectrométrie de masse et/ou séquençage et recherche d'homologie
30 dans les banques de données (NCBI [http :/www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov), Basic Blast Search, Protein Blastp, les séquences protéiques sont entrées en format FASTA dans la base de données nr, l'algorithme utilisé est Matrix BLOSUM62, l'identité dénommée

“ Identities ” correspond au nombre d’acides aminés identiques donné en pourcentage et la positivité “ Positives ” correspond aux acides aminés présentant une équivalence biologique selon les paramètres susmentionnés du logiciel donnés en pourcentage). Ces protéines appartiennent aux familles des protéines du Perlecan, du précurseur de la protéine plasmatiche de liaison au rétinol, du précurseur de l’activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline et de la saposine B. Plus précisément, les protéines sont (i) pour la bande de 20 kD le fragment C-terminal du Perlecan qui commence à l’acide aminé 3464 et se termine à l’acide aminé 3707 (Murdoch AD et al. J Biol Chem, 1992, April 25 ;267 (12) :8544-47), et référencé dans l’identificateur de séquences SEQ ID N° 2 (la protéine entière Perlecan étant référencée en SEQ ID N°1), (ii) pour la bande de 20 kD le précurseur de la protéine plasmatiche de liaison au rétinol (Monaco HL et al., Science, 1995, 268 (5213) :1039-1041) dont la séquence est donnée en SEQ ID N° 4, (iii) pour la bande de 18 kD le précurseur de l’activateur du ganglioside GM2 (Furst W et al., Euro J Biochem, 1990, Sep 24 ; 193(3) :709-14) identifié en SEQ ID N° 8, (iv) pour la bande de 14 kD la calgranuline B (Lagasse E et al., Mol Cell Biol, 1988, Jun ;8(6) :2402-10) identifiée en SEQ ID N° 17 et (v) pour la bande de 8 kD la saposine B (Kleinschmidt T et al., Biol Chem Hoppe Seyler, 1988, Dec ;369(12) :1361-5) représentée en SEQ ID N° 24. Ils ont par ailleurs mis également en évidence la présence de séquences variantes auxdites séquences de référence, en particulier pour la bande de 18 kD une séquence variante du précurseur de l’activateur du ganglioside GM2 référencée SEQ ID N° 9. Ces séquences protéiques variantes sont le produit de mutations au niveau des gènes codant pour lesdites protéines ou sont le résultats de phénomènes d’épissage. Il est à noter par exemple que la calprotectine est un variant de la calgranuline B.

Le fragment C-terminal de la protéine Perlecan (SEQ ID N° 2) est codée par exemple par la séquence nucléotidique ADN SEQ ID N° 69, en tenant compte du code génétique. La protéine précurseur de la protéine plasmatiche de liaison au rétinol (SEQ ID N° 4) est codée par exemple par la séquence nucléotidique ADN SEQ ID N° 70, en tenant compte du code génétique. La protéine activatrice du GM2 (SEQ ID N° 8) est codée par exemple par la séquence nucléotidique ADN SEQ ID N° 31, en tenant compte du code génétique. Les peptides FSWDNCFEKG DPAVIR et YSLPKSEFAV PDLELP issus du polypeptide muté activateur du GM2 (SEQ ID N°9) sont codés par les

séquences nucléotidiques ADN SEQ ID N° 66 et SEQ ID N° 67 respectivement, en tenant compte du code génétique. La protéine calgranuline B (SEQ ID N° 17) est codée par exemple par la séquence nucléotidique ADN SEQ ID N° 42, en tenant compte du code génétique. La protéine saposine B (SEQ ID N° 24) est codée par exemple par la
5 séquence nucléotidique ADN SEQ ID N° 53, en tenant compte du code génétique.

Par famille de protéines on entend l'ensemble des protéines codées à partir d'un même gène d'ADN et qui résultent d'un multi-épissage différentiel du gène et/ou d'un cadre de lecture différent. Le gène ADN est transcrit avec des phénomènes d'épissage alternatif ce qui conduit à la traduction de différentes séquences primaires
10 de protéines. Toutes ces protéines appartiennent à une même famille protéique. On inclut également dans le terme " famille protéique ", les protéines qui présentent au moins 70% d'identité, de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec une séquence protéique de référence de la famille.

On entend par multi-épissage, un épissage intervenant au moins une fois
15 dans la région nucléotidique d'intérêt.

Par exemple, par famille de protéine précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, on désigne la famille de protéines comprenant *au moins* les protéines ou fragment de protéines de séquence SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, et les protéines codées par le gène correspondant selon différents
20 cadres de lecture.

Par exemple, par famille de protéine activatrice du GM2, on désigne la famille de protéines comprenant *au moins* les protéines ou fragments de protéines de séquence SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, et les protéines codées
25 par le gène correspondant selon différents cadres de lecture, qui résultent d'un multi-épissage différentiel du gène et/ou d'un cadre de lecture différent.:

Par exemple, par famille de protéine calgranuline B, on désigne la famille de protéines comprenant *au moins* les protéines ou fragments de protéines de séquence SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID
30 N° 22, SEQ ID N° 23, et les protéines codées par le gène correspondant selon différents cadres de lecture, qui résultent d'un multi-épissage différentiel du gène et/ou d'un cadre de lecture différent. Les protéines MRP14 (SEQ ID N° 17) et MRP8 (SEQ ID N°

18) ont une séquence protéique différente tout en étant codées par un même gène ; elles appartiennent à la même famille protéique.

Par exemple, par famille de protéine saposine B, on désigne la famille de protéines comprenant *au moins* les protéines ou fragments de protéines de séquence
5 SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28, SEQ ID N° 29, et les protéines codées par le gène correspondant selon différents cadres de lecture, qui résultent d'un multi-épissage différentiel du gène et/ou d'un cadre de lecture différent.

Par famille d'acides nucléiques codant pour une protéine on entend
10 l'ensemble des séquences nucléiques ADNc et/ou ARN transcrits à partir d'un même gène ADN et, qui résultent d'un multi-épissage différentiel. Le gène ADN est transcrit avec des phénomènes d'épissage différentiels et conduit à la synthèse de différents acides nucléiques (ADNc, ARN) de séquences différentes. Toutes ces séquences ADNc et ARNm sont considérées comme appartenant à une même famille d'acides
15 nucléiques.

Par exemple, par famille d'acides nucléiques codant pour la famille de protéine précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, on désigne la famille d'acides nucléiques comprenant *au moins* les acides nucléiques ou fragments de séquence SEQ ID N°30.

20 Par exemple, par famille d'acides nucléiques codant pour la famille de protéine activatrice du GM2, on désigne la famille d'acides nucléiques comprenant *au moins* les acides nucléiques ou fragments de séquences SEQ ID N° 31, SEQ ID N° 32, SEQ ID N° 33, SEQ ID N° 34, SEQ ID N° 35, SEQ ID N° 36, SEQ ID N° 37, SEQ ID N° 38, SEQ ID N° 39, SEQ ID N° 40, SEQ ID N° 41 qui résultent d'un multi-épissage
25 différentiel du gène et/ou d'un cadre de lecture différent.

Par exemple, par famille d'acides nucléiques codant pour la famille de protéine calgranuline B, on désigne la famille d'acides nucléiques comprenant *au moins* les acides nucléiques ou fragments de séquences SEQ ID N° 42, SEQ ID N° 43, SEQ ID N° 44, SEQ ID N° 45, SEQ ID N° 46, SEQ ID N° 47, SEQ ID N° 48, SEQ ID
30 N° 49, SEQ ID N° 50, SEQ ID N° 51, SEQ ID N° 52 qui résultent d'un multi-épissage différentiel du gène et/ou d'un cadre de lecture différent.

Par exemple, par famille d'acides nucléiques codant pour la famille de protéine saposine B, on désigne la famille d'acides nucléiques comprenant *au moins* les acides nucléiques ou fragment de séquences SEQ ID N° 53, SEQ ID N° 54, SEQ ID N° 55 qui résultent d'un multi-épissage différentiel du gène et/ou d'un cadre de lecture différent.

Par « épissage » on entend un mécanisme d'excision des introns et de raboutage des exons au cours de la maturation des transcrits et par "épissage différentiel" on entend l'existence de plusieurs schémas d'épissage d'un transcrit primaire aboutissant à la formation de différents ARN messagers et, pouvant donner lieu à la synthèse de plusieurs protéines différentes (Kaplan et Delpech, Biologie Moléculaire et Médecine, 1993, 2^{ème} édition, Médecine et Sciences, Flammarion, pages 73-77). CE phénomène est largement décrit dans la littérature scientifique. A titre d'exemple, on peut citer le modèle des gènes qui codent pour les chaînes lourdes et légères des immunoglobulines, le modèle du gène de la dystrophine, le modèle du gène de l'alpha amylase, le gène de la myéline, etc...

Il est connu que les gènes eucaryotes, notamment, comprennent des régions (exons) qui codent pour des fragments de la protéine codée par ledit gène et d'autres régions (introns) qui n'ont pas d'équivalent protéique. Ceci est dû au fait que les gènes sont d'abord transcrits en un ARN "primaire" qui est ensuite coupé par des enzymes d'épissage au niveau de sites nucléotidiques spécifiques (sites d'épissage). Ces enzymes raboutent ensuite les régions codant pour la protéine, reconstituant ainsi un ARN "secondaire" dont les régions introniques ont été éliminées. Par ailleurs, selon les phénotypes cellulaires (et donc les tissus ou la différenciation) ces enzymes ne sont pas toutes exprimées et, ainsi, un même ARN peut être épissé différemment dans les cellules d'un même individu, générant ainsi des protéines avec des différences de séquence. Cependant, ces phénomènes peuvent aussi s'appliquer à des régions nucléotidiques qui sont entièrement codantes (exons), mais qui, selon différents épissages possibles vont générer plusieurs protéines différentes à partir de la même région nucléotidique, par phénomène d'épissage différentiel entre les différents produits protéiques.

De plus, il est connu que des régions nucléotidiques peuvent avoir plusieurs cadres de lecture selon les trois trames potentielles du code génétique. Ainsi,

la présence de plusieurs codons initiateurs de traduction dans plusieurs phases de lecture et/ou un épissage d'ARN primaire raboutant des séquences nucléotiques présentes dans des phases de lectures différentes sur l'ADN, permet à une même région ADN de générer des produits protéiques sans rapports entre eux, du point de vue de la
5 séquence peptidique.

Enfin, le polymorphisme génétique existant entre les individus d'une même espèce et/ou des mutations individuelles peuvent créer ou supprimer des sites d'épissage dans une région ADN donnée et, ainsi, modifier la séquence et la structure du ou des produits protéiques normalement produits par cette région.

10 Ainsi, la combinaison de ces différents phénomènes peut permettre qu'une même séquence nucléotidique correspondant à un segment d'ADN, identifiée comme déterminant une région génétique d'intérêt dans une étude donnée, comprenne l'information nécessaire et suffisante pour définir toute une famille d'ARN épissés selon des schémas différentiels et alternatifs, dans des cadres de lecture divers et, par là
15 évidemment, de protéines et de polypeptides ayant des séquences " mosaïques " selon un cadre de lecture voire selon les trois cadres potentiels et des mutations éventuellement liées au polymorphisme génétique.

Un exemple de ce phénomène peut être représenté par la région nucléotidique du gène *env* du rétrovirus HIV-1. En effet, plusieurs protéines différentes
20 sont codées par des segments de la même séquence : par exemple, la glycoprotéine d'enveloppe, et les protéines régulatrices TAT, REV, NEF, VIF.

Il est encore connu que des protéines peuvent résulter de l'assemblage de sous-unités identiques (homodimères, homomultimères) ou différentes (hétérodimères, hétéromultimères). Ainsi, les différents produits protéiques codés par une même région
25 ADN peuvent aussi s'assembler entre eux pour constituer des entités protéiques complexes multimériques. Ce phénomène s'ajoute aux précédents et, lorsqu'une protéine est identifiée par un fragment peptidique, on peut logiquement identifier tous les autres éléments constitutifs de cette protéine complexe et les segments ADN et ARN épissé qui les codent, ainsi que tous les membres de la famille de produits protéiques et leurs assemblages.

30 Un autre exemple est fourni par la région d'ADN humain codant pour la famille de protéines MRP14 ou calgranuline B, MRP8, calprotectine, psoriasine etc...

Aussi, la présente invention a pour objet l'utilisation d'au moins un polypeptide comprenant au moins un fragment d'une protéine pour obtenir une

composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, pronostiquer, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou auto-immune, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29 et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques précitées, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B. Dans des modes de réalisation particuliers au moins deux polypeptides précités sont utilisés en combinaison pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, pronostiquer, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou auto-immune.

L'invention concerne également l'utilisation d'au moins un polypeptide comprenant au moins un fragment d'une protéine pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, pronostiquer, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou auto-immune, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 17 et SEQ ID N° 24 et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques précitées. Avantageusement les cinq polypeptides qui répondent à la définition précédente sont utilisés en combinaison.

De préférence, la séquence peptidique dudit polypeptide comprend, ou consiste en une séquence choisie parmi l'une quelconque des SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 17 et SEQ ID N° 24.

L'invention concerne encore l'utilisation d'au moins un fragment d'un des polypeptiques précités pour la préparation d'un peptide immunogène, ledit peptide comprenant tout ou partie d'au moins une des séquences référencées SEQ ID N°s 58 à 65 et étant utilisé pour la production d'anticorps monoclonaux.

L'invention a également pour objet, l'utilisation d'au moins un fragment nucléotidique, pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, pronostiquer, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou auto-immune, selon laquelle ledit fragment nucléotidique est choisi parmi des fragments qui codent pour au moins un fragment d'une protéine, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 ET SEQ ID N° 29 et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques ci dessus, et les fragments complémentaires desdits fragments, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B. Il est à la portée de l'homme du métier de déterminer les séquences nucléiques des fragments nucléotidiques à partir des séquences peptidiques et du code génétique, ceci faisant partie de ses connaissances générales.

De préférence, ledit fragment nucléotidique code pour une protéine qui à l'état natif consiste en une séquence choisie parmi l'une quelconque des SEQ ID N°s 1 à 8 et SEQ ID N°s 10 à 29 précitées, et parmi les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies

parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B.

Un autre objet de l'invention est l'utilisation d'au moins un fragment
5 nucléotidique pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, pronostiquer, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune selon laquelle ledit fragment est un fragment d'une séquence nucléique choisie parmi l'une quelconque des SEQ ID N° 30, SEQ ID N° 31, SEQ ID N° 32, SEQ ID N° 33,
10 SEQ ID N° 34, SEQ ID N° 35, SEQ ID N° 36, SEQ ID N° 37, SEQ ID N° 38, SEQ ID N° 39, SEQ ID N° 40, SEQ ID N° 41, SEQ ID N° 42, SEQ ID N° 43, SEQ ID N° 44, SEQ ID N° 45, SEQ ID N° 46 et SEQ ID N° 47, SEQ ID N° 48, SEQ ID N° 49 et SEQ ID N° 50, SEQ ID N° 51, SEQ ID N° 52, SEQ ID N° 53, SEQ ID N° 54, SEQ ID N° 55, SEQ ID N° 56, SEQ ID N° 57, SEQ ID N° 67, SEQ ID N° 66, SEQ ID N° 69, SEQ
15 ID N° 70 et SEQ ID N° 71 et leurs séquences complémentaires.

L'invention concerne également l'utilisation d'un ligand spécifique d'un polypeptide ou d'un fragment nucléotidique tel que défini ci dessus pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, pronostiquer, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie
20 dégénérative et/ou auto-immune.

Par ligand, on entend toute molécule susceptible de s'associer au polypeptide, tel que un anticorps monoclonal, un anticorps polyclonal, un récepteur, un substrat d'activité enzymatique, une enzyme dont ledit polypeptide est un cofacteur. La production d'anticorps polyclonaux et monoclonaux fait partie des connaissances
25 générales de l'homme du métier. On peut citer à titre de référence Köhler G. et Milstein C. (1975) : Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity, Nature 256 :495-497 et Galfre G. et al. (1977) Nature, 266 : 522-550 pour la production d'anticorps monoclonaux et Roda A., Bolelli G.F. : Production of high-titer antibody to bile acids, Journal of Steroid Biochemistry, Vol. 13, pp. 449-454
30 (1980) pour la production d'anticorps polyclonaux.

Par ligand, on entend également toute molécule susceptible de s'associer à un fragment nucléotidique, tel qu'un fragment nucléotidique partiellement ou

5 totalement complémentaire, un polynucléotide complémentaire, un anticorps anti-acides nucléiques. La production de fragments nucléotidiques ou de polynucléotides fait partie des connaissances générales de l'homme du métier. On peut notamment citer l'utilisation d'enzymes de restriction, et la synthèse chimique sur synthétiseur automatique, par exemple sur des synthétiseurs commercialisés par la société Applied Biosystem. Par ailleurs, on connaît des techniques pour la production d'anticorps anti-acides nucléiques. On peut citer à titre d'exemples Philippe Cros et al., Nucleic Acids Researc, 1994, Vol. 22, N° 15, 2951-2957 ; Anderson, W.F. et al. (1988) Bioessays, 8 (2), 69-74 ; Lee, J.S. et al. (1984) FEBS Lett., 168, 303-306 ; Malfoy, B. et al. (1982) 10 Biochemistry, 21(22), 5463-5467 ; Stollar, B.D. et al., J.J. (eds) Methods in Enzymology, Academic Press, pp. 70-85 ; Traincard, F. et al. (1989) J. Immunol. Meth., 123, 83-91 et Traincard, F. et al. (1989) Mol. Cell. Probes, 3, 27-38).

L'invention a encore pour objet un procédé pour détecter au moins une protéine associée à une maladie dégénérative et/ou auto-immune, dans un échantillon 15 biologique dans lequel on met en contact l'échantillon biologique avec au moins un ligand spécifique d'au moins un polypeptide, ledit polypeptide comprenant au moins un fragment d'une protéine et ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ 20 ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29 et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement 25 au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à SEQ ID N° 8 et SEQ ID N° 10 à 29, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B, puis on 30 détecte la formation d'un complexe entre ledit polypeptide et ledit ligand. Ledit ligand est avantageusement un anticorps monoclonal, un anticorps polyclonal, un récepteur,

un substrat d'activité enzymatique ou une enzyme dont ledit polypeptide est un cofacteur.

De même, l'invention concerne un procédé pour détecter au moins un ligand associé à une maladie dégénérative et/ou auto-immune, dans un échantillon biologique, caractérisé en ce que l'on met en contact l'échantillon biologique avec au moins un polypeptide comprenant au moins un fragment d'une protéine, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29 et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à SEQ ID N° 8 et SEQ ID N°s 10 à SEQ ID N° 29, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B, puis on détecte la formation d'un complexe entre ledit polypeptide et ledit ligand. Le ligand est toute molécule qui répond aux conditions précédemment décrites.

De préférence, dans les procédés décrits ci dessus la séquence du polypeptide comprend ou consiste en une séquence peptidique choisie parmi l'une quelconque des SEQ ID N° 1 à 8 et SEQ ID N° 10 à 29 précédentes et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B.

L'invention concerne également un nouveau polypeptide qui comprend au moins un fragment d'une protéine dont la séquence peptidique correspond à SEQ ID N° 9, ledit fragment présentant au moins une mutation, en particulier au moins deux mutations par rapport à la séquence de référence SEQ ID N° 8. Le polypeptide est

avantageusement choisi parmi les polypeptides qui comprennent la séquence en acides aminés FSWDNCFEGKDPAVIR, référencée SEQ ID N° 68 et la séquence en acides aminés YSLPKSEFAVPDLELP, référencée SEQ ID N° 72.

En particulier, ledit polypeptide comprend ou consiste en SEQ ID N° 9.

5 Ce polypeptide est utilisé pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, pronostiquer, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou auto-immune, seul ou en mélange avec au moins un polypeptide tel que défini précédemment.

L'un des objet de l'invention est également un fragment nucléotidique qui
10 code pour le fragment de la protéine dont la séquence peptidique correspond à SEQ ID N° 9, ledit fragment de ladite protéine présentant au moins une mutation, en particulier deux mutations par rapport à la séquence de référence SEQ ID N° 8. Ledit fragment nucléotidique, en particulier, comprend ou consiste en un fragment qui code pour SEQ ID N° 9. Ce fragment est utilisé pour obtenir une composition diagnostique,
15 pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou auto-immune, seul ou en mélange avec au moins un fragment nucléotidique tel que défini précédemment.

L'invention a aussi pour objet un procédé pour détecter au moins un ligand associé à une maladie dégénérative et/ou auto-immune, dans un échantillon
20 biologique, selon lequel on met en contact l'échantillon biologique avec au moins le polypeptide qui comprend ou consiste en SEQ ID N° 9 ou un mélange de polypeptides comprenant ce polypeptide et au moins un polypeptide tel que décrit ci dessus, puis on détecte la formation d'un complexe ou de complexes entre le ou les polypeptides et le ou les ligands correspondants ; étant entendu que par ligand on entend une molécule
25 qui répond aux conditions précitées.

L'invention concerne également un procédé pour détecter au moins le polypeptide référence SEQ ID N° 9 ou un fragment dudit polypeptide, ce fragment comprenant au moins une et de préférence deux mutations par rapport à la séquence de référence SEQ ID N°8, dans un échantillon biologique selon lequel on met en contact
30 l'échantillon biologique avec au moins un ligand spécifique dudit polypeptide, puis on détecte la formation d'un complexe entre ledit polypeptide et ledit ligand. La définition de ligand correspond à celle définie précédemment. Il peut s'agir entre autres d'un

anticorps monoclonaux, d'un anticorps polyclonal, d'un substrat d'activité enzymatique, ou d'une enzyme dont ledit polypeptide est un cofacteur, d'un récepteur.

On peut également mettre en contact l'échantillon biologique avec un ligand spécifique du polypeptide référence SEQ ID N°9 et au moins un ligand
5 spécifique d'au moins un autre polypeptide tel que défini précédemment, puis on détecte la formation de complexes entre lesdits polypeptides et lesdits ligands spécifiques desdits polypeptides ; étant entendu que par ligand on entend une molécule qui répond aux conditions décrites précédemment.

Un autre objet de l'invention est un fragment nucléotidique codant pour
10 tout ou partie du polypeptide SEQ ID N° 9, et son utilisation pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, pronostiquer, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou auto-immune, éventuellement en association avec au moins un fragment nucléotidique tel que défini précédemment, et les fragments complémentaires
15 desdits fragments.

Par fragment polypeptidique, on entend au moins tout ou partie de la séquence peptidique d'une protéine, en particulier un fragment polypeptique qui comprend environ entre 5 et 15 acides aminés et plus précisément environ entre 5 et 10 acides aminés et 6 et 15 acides aminés. Et par fragment nucléotidique, on entend au
20 moins tout ou partie d'une séquence nucléotidique, étant entendu que par séquence nucléotidique, sont couvertes les séquences ADN et ARN.

En particulier, par fragment polypeptidique ou nucléotidique, on entend soit des fragments associés à une même unité moléculaire, soit des fragments dans un complexe moléculaire comprenant plusieurs sous-unités homologues ou hétérologues
25 obtenues de manière naturelle ou artificielle, notamment par multi-épissage différentiel ou par synthèse sélective.

L'invention concerne aussi un procédé pour détecter au moins un polypeptide tel que défini précédemment, selon lequel on prélève un échantillon d'un fluide biologique d'un patient présentant un état pathologique associé à une maladie
30 dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune et éventuellement après purification dudit échantillon de fluide biologique, on analyse par spectrométrie de

masse le profil de masse obtenu à partir du fluide biologique et on compare à un profil de masse de référence.

La présente invention concerne également l'utilisation d'au moins un polypeptide de l'invention pour définir des agents efficaces thérapeutiquement, et l'utilisation de ces agents pour prévenir et/ou traiter une maladie auto-immune et/ou neurologique et/ou dégénérative, en particulier la sclérose en plaques.

Ainsi, d'autres objets de l'invention sont les suivants :

- Utilisation d'au moins un polypeptide comprenant au moins un fragment d'une protéine pour tester l'efficacité d'un agent thérapeutique, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29, les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisie parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B ;

- Utilisation d'au moins un polypeptide comprenant au moins un fragment d'une protéine pour définir un matériel biologique pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement d'une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, telle que la sclérose en plaques, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ

ID N° 29, les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisie parmi le perlacan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison
5 au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline et de la saposine ;

Selon une variante avantageuse de l'une des utilisations précédentes, le polypeptide est choisi parmi SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24 ;

10 - Utilisation d'au moins un fragment nucléotidique, pour tester l'efficacité d'un agent thérapeutique pour un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, selon laquelle ledit fragment nucléotidique est choisi parmi les fragments qui codent pour au moins un fragment d'une protéine, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif
15 correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ
20 ID N° 28 et SEQ ID N° 29, les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et les fragments complémentaires desdits fragments et les fragments qui codent pour les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de
25 protéines choisie parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B.

- Utilisation pour tester l'efficacité d'un agent thérapeutique pour un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-
30 immune, de protéines recombinantes et/ou codées par tout ou partie des fragments nucléotidiques définis au paragraphe précédent ;

- Utilisation d'au moins un fragment nucléotidique pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement d'une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, telle que la sclérose en plaques, selon laquelle ledit fragment nucléotidique est choisi parmi des fragments qui codent pour au moins un fragment d'une protéine, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29, les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et les fragments complémentaires desdits fragments et les fragments qui codent pour les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisie parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B ;

- Utilisation pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement d'une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, telle que la sclérose en plaques, de protéines recombinantes et/ou codées par tout ou partie des fragments nucléotidiques définis au paragraphe précédent.

Avantageusement, ledit fragment nucléotidique utilisé code pour ladite protéine.

De préférence, la séquence peptidique de ladite protéine à l'état natif consiste en une séquence choisie parmi l'une quelconque des SEQ ID N° 1 à 29, les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du

précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B. Les polypeptides sont préférentiellement choisis parmi SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24.

- Utilisation d'au moins un fragment nucléotidique, pour tester l'efficacité d'un agent thérapeutique pour un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune selon laquelle ledit fragment est un fragment d'une séquence nucléique choisie parmi l'une quelconque des SEQ ID N° 30, SEQ ID N° 31, SEQ ID N° 32, SEQ ID N° 33, SEQ ID N° 34, SEQ ID N° 35, SEQ ID N° 36, SEQ ID N° 37, SEQ ID N° 38, SEQ ID N° 39, SEQ ID N° 40, SEQ ID N° 41, SEQ ID N° 42, SEQ ID N° 43, SEQ ID N° 44, SEQ ID N° 45, SEQ ID N° 46 et SEQ ID N° 47, SEQ ID N° 48, SEQ ID N° 49 et SEQ ID N° 50, SEQ ID N° 51, SEQ ID N° 52, SEQ ID N° 53, SEQ ID N° 54, SEQ ID N° 55, SEQ ID N° 56, SEQ ID N° 57, SEQ ID N° 66, SEQ ID N° 67, SEQ ID N° 69, SEQ ID N° 70, SEQ ID N° 71, et leurs séquences complémentaires.

- Utilisation d'au moins un fragment nucléotidique pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement d'une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, telle que la sclérose en plaques selon laquelle ledit fragment est un fragment d'une séquence nucléique choisie parmi l'une quelconque des SEQ ID N° 30, SEQ ID N° 31, SEQ ID N° 32, SEQ ID N° 33, SEQ ID N° 34, SEQ ID N° 35, SEQ ID N° 36, SEQ ID N° 37, SEQ ID N° 38, SEQ ID N° 39, SEQ ID N° 40, SEQ ID N° 41, SEQ ID N° 42, SEQ ID N° 43, SEQ ID N° 44, SEQ ID N° 45, SEQ ID N° 46 et SEQ ID N° 47, SEQ ID N° 48, SEQ ID N° 49 et SEQ ID N° 50, SEQ ID N° 51, SEQ ID N° 52, SEQ ID N° 53, SEQ ID N° 54, SEQ ID N° 55, SEQ ID N° 56, SEQ ID N° 57, SEQ ID N° 66, SEQ ID N° 67, SEQ ID N° 68, SEQ ID N° 69, SEQ ID N° 70, SEQ ID N° 71, et leurs séquences complémentaires.

La séquence nucléique est de préférence choisie parmi SEQ ID N° 30, 31, 42, 53.

- Utilisation de la lycorine pour la préparation d'une composition pour la prévention et/ou le traitement de maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune.

Par efficacité thérapeutique, on entend le bénéfice clinique et biologique acquis après administration d'un agent thérapeutique en vue d'une amélioration, voire

d'une guérison de la maladie. Ce bénéfice se traduit entre autre par une diminution des signes cliniques, biologiques, et des effets pathologiques de la maladie après une analyse clinique par le médecin et/ou des analyses biologiques, telles que imagerie par résonance magnétique, analyse des bandes oligoclonales dans le liquide céphalo-
5 rachidien, analyse de potentiels évoqués et le test de détection de gliotoxicité appelé bio-essai, dont le principe est décrit dans la demande de brevet WO 98/11439 précédemment citée. Cette diminution des signes cliniques et effets pathologiques doit entraîner un bénéfice pour le patient (Schwartz et Lazar, 1995, Elements de statistique médicale et biologique, eds Flammarion ; Lazar et Schwartz, 1995, Eléments de
10 statistique médicale et biologique, eds Flammarion). La maladie étudiée de préférence est la sclérose en plaques.

On entend par composition à usage prophylactique et/ou thérapeutique, toute composition qui comprend un agent thérapeutiquement efficace. Ces agents thérapeutiques sont capables (i) d'influencer de manière qualitative et/ou quantitative
15 l'activité biologique et/ou la fonction des protéines d'intérêt identifiées dans la présente invention, de préférence l'activité gliotoxique et/ou (ii) de moduler et/ou d'inhiber l'expression de ces protéines et/ou (iii) de diminuer la concentration de ces protéines dans un compartiment extracellulaire et/ou intracellulaire, et/ou de substituer une forme non pathogène à une forme pathogène, par exemple mutée, d'une de ces protéines et/ou
20 de moduler leur fixation à au moins un de leur ligand ; ledit ligand étant une molécule qui répond aux critères précédemment décrits. Différents agents thérapeutiques sont produits en suivant les approches classiques largement décrites dans la littérature. Les différents groupes d'agents thérapeutiques définis à partir des protéines d'intérêt identifiées dans cette présente invention sont décrits ci-dessous. Leur activité ou
25 efficacité prophylactique et/ou thérapeutique est évaluée *in vitro* et/ou *in vivo*.

Evaluation de l'efficacité d'un agent thérapeutique *in vitro* : des échantillons d'urine d'individus sains et de patients atteints de la sclérose en plaque, de préférence en phase active, sont testés pour leur activité gliotoxique *in vitro* en suivant le protocole du bio-essai décrit dans la demande de brevet WO 98/11439,
30 précédemment citée. L'expérience est réalisée en parallèle en ajoutant ou non dans les échantillons d'urine testés l'agent thérapeutique dont l'efficacité est à tester. Des essais sont réalisés à différentes concentrations de cet agent, et après différents temps

d'incubation avec l'échantillon, à une température d'environ 37°C ou à température ambiante, pour chaque concentration d'agent testé, avant la réalisation du test bio-essai. L'activité gliotoxique est déterminée pour chaque échantillon brut ou purifié d'urine témoin et de patient en présence ou en absence de l'agent thérapeutique testé. Un agent
5 prophylactique et/ou thérapeutique pour la sclérose en plaques est un agent qui permet une diminution ou une inhibition de l'activité gliotoxique dans un fluide biologique des patients, en particulier dans l'urine. Cette diminution ou inhibition est évaluée par rapport à l'activité gliotoxique détectée dans le fluide biologique des patients SEP en absence de l'agent testé qui fixe la borne supérieure et par rapport à l'activité
10 gliotoxique détectée dans l'urine d'individu sain qui détermine la borne inférieure (Schwartz et Lazar, 1995, Elements de statistique médicale et biologique, eds Flammarion ; Lazar et Schwartz, 1995, Elements de statistique médicale et biologique, eds Flammarion). L'efficacité thérapeutique de plusieurs agents peuvent être évaluée en combinaison dans un même essai.

15 Evaluation de l'efficacité d'un agent thérapeutique utilisant un modèle animal : à un animal sont injectées des fractions d'urine purifiée et/ou au moins un polypeptide de l'invention et/ou au moins une protéine obtenue par recombinaison génétique qui correspond à au moins un polypeptide de l'invention et/ou au moins un polypeptide de synthèse dont la séquence en acides aminés correspond à la séquence
20 d'au moins un polypeptide de l'invention. Les injections sont effectuées, à différentes concentrations établies, à des animaux mammifères, tels que souris ou rat, de préférence un rat Lewis selon le protocole décrit dans la demande de brevet WO97/33466 citée précédemment. A des séries d'animaux sont injectées, par voie intradermique, intraveineuse, intrathécale, intracérébrale, intramusculaire, ou autres,
25 différentes concentrations d'une fraction d'urine brute ou purifiée ou d'au moins un polypeptide et/ou une protéine, tels que définis ci-dessus. Un contrôle négatif est effectué en parallèle. L'agent prophylactique et/ou thérapeutique à évaluer et ensuite injecté à différentes concentrations et par différentes voies d'administration à un animal mammifère, de préférence à une souris ou à un rat. Les injections sont réalisées
30 en une seule dose ou en doses répétées, avec différents temps d'intervalle entre chaque administration. Quelques heures à quelques semaines après l'administration, des

échantillons biologiques, de préférence du sang, du sérum, du liquide céphalo-rachidien, de l'urine sont prélevés. Sur ces échantillons sont réalisés :

- (i) une mesure de l'activité gliotoxique par le bio-essai, et/ou
- (ii) une mesure d'activité des polypeptides et/ou protéines d'intérêt de l'invention, seuls ou en combinaison comme décrit au moins dans : Li et al., 1983, Am J Hum Genet 35 :629-634 ; Li et al., 1988 J Biol Chem 263 : 6588-6591 ; Li et al., 1981 J Biol Chem 256 : 6234-6240 ; Li et al., 1976 J Biol Chem 251 :1159 ; Kase et al., 1996, FebsLetters 393 : 74-76 ; Kishimoto et al., 1992, J Lipid Res 33 : 1255-1267 ; O'Brien et al., 1991 Faseb J 5 : 301-308 ; Murthy et al., 1993 J Immunol 151 : 6291-6301 ;
10 Murao et al., 1990 Cell growth Differ 1 : 447-454, et/ou
- (iii) un dosage des polypeptides et/ou protéines d'intérêt, seuls ou en combinaison, par ELISA (Enzyme Linked-Immunosorbant Assay) et/ou Western Blot, en utilisant des anticorps ou des fragments d'anticorps capables de se fixer à au moins un des polypeptides et/ou protéines de l'invention, ou leur fragment, et/ou
- 15 iv) un dosage d'anticorps spécifiques des polypeptides et/ou protéines d'intérêt ou leurs fragments, seuls ou en combinaison ou le dosage d'au moins un ligand capable de se fixer aux polypeptides et/ou protéines d'intérêt ou leurs fragments, et/ou
- (v) un dosage de la réponse immune cellulaire « helper » et/ou cytotoxique induite contre les polypeptides et protéines d'intérêt ou leurs fragments et tout peptide
20 immunogène dérivant de ces polypeptides, protéines et fragments, en réalisant, par exemple, un test d'activation *in vitro* de cellules lymphocytes T " helper " spécifiques de l'antigène administré ; en quantifiant les lymphocytes T cytotoxiques selon la technique dite ELISPOT décrite par Scheibenbogen et al., 1997 Clinical Cancer Research 3 : 221-226. Une telle détermination est particulièrement avantageuse lorsque
25 l'on veut évaluer l'efficacité d'une approche vaccinale pour la mise en œuvre chez un patient donné ou pour diagnostiquer et/ou pronostiquer un état pathologique potentiel en cherchant à mettre en évidence une réponse immune naturellement développée par le patient contre l'antigène, les polypeptides, les protéines d'intérêt ou les fragments immunogènes dérivés de ces protéines.

30 Par « ligand capable de se fixer à une protéine », on entend toute molécule capable de reconnaître la protéine ou une partie de la protéine. Cela peut être vérifié par exemple *in vitro* par tests Elisa et/ou Western blot .

On désigne par « polypeptides et/ou protéines d'intérêt de l'invention » le fragment C-terminal du perlecan (SEQ ID N°2), le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol (SEQ ID N°4), la protéine activateur du GM2 (SEQ ID N° 8), la protéine mutée de l'activateur du GM2 (SEQ ID N° 9), la calgranuline B (SEQ ID N° 17), la saposine B (SEQ ID N° 24), les protéines ou fragments appartenant à la famille du précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol (par exemple SEQ ID N° 5 à 7), les protéines ou fragments appartenant à la famille de la protéine activateur du GM2 (par exemple SEQ ID N° 10 à 16), les protéines ou fragments appartenant à la famille de la protéine calgranuline B (par exemple SEQ ID N° 18 à 23), les protéines ou fragments appartenant à la famille de la protéine saposine B (par exemple SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29.

L'animal est ensuite sacrifié et des coupes histologiques de différents tissus sont réalisées, de préférence des coupes de cerveaux. Différentes études et observations sont réalisées pour détecter et/ou quantifier les effets caractéristiques des polypeptides et/ou protéines actives associées à la fraction gliotoxique, c'est à dire une apoptose des cellules gliales, et/ou l'ouverture de la barrière hémato-encéphalique, et/ou une démyélinisation. La présence ou l'expression des polypeptides et/ou protéines d'intérêt identifiées est également observée et/ou quantifiée dans ces tissus :

- (i) par des analyses d'immunohistologie classiques en utilisant des ligands des polypeptides et/ou protéines d'intérêt et/ou leurs fragments et/ou des anticorps monoclonaux ou polyclonaux ou des fragments desdits qui se lient aux polypeptides et/ou protéines d'intérêt, ou à leurs fragments, et/ou
- (ii) par des techniques d'hybridation *in situ* classiques en utilisant des fragments d'acides nucléiques ou des oligonucléotides définis à partir des séquences polypeptidiques et/ou protéiques d'intérêt ; et/ou
- (iii) par des techniques d'amplification par PCR et/ou RT-PCR *in situ* en utilisant des fragments d'acides nucléiques ou des amorces définis à partir des séquences polypeptidiques et/ou protéiques d'intérêt.

Par anticorps capable de se fixer à un polypeptide, à une protéine ou à leurs fragments, on entend tout anticorps monoclonal ou polyclonal et tout fragment

desdits anticorps capable de reconnaître le polypeptide, la protéine ou leurs fragments. La capacité des anticorps à reconnaître lesdits polypeptides, protéines ou leurs fragments est vérifiée *in vitro*, par exemple en ELISA et/ou Western Blot. Un anticorps capable de se fixer à la protéine saposine B (SEQ ID N° 24) ou à tout
5 fragment de cette protéine est décrit par Misasi et al. 1998, J. NeuroChem. 71 : 2313 et Klein et al. 1994, BBRC 200 : 1440-1448 ou peut être produit en utilisant les méthodes conventionnelles, par exemple celles référencées précédemment pour la production d'anticorps monoclonaux et polyclonaux, par immunisation à partir de la protéine naturelle, d'une protéine recombinante, d'un polypeptide de synthèse ou de leurs
10 fragments. Les peptides immunogènes pour la production d'anticorps monoclonaux anti-saposine B sont les peptides correspondant aux séquences SEQ ID N° 61 et SEQ ID N° 62.

Par exemple, un anticorps capable de se fixer à la protéine activatrice du GM2 (SEQ ID N° 8) ou à tout fragment de cette protéine est illustré par Yuziuk *et al.*,
15 1998 J Biol Chem 273 : 66-72 ou peut être produit en utilisant les méthodes conventionnelles connues de l'homme de l'art. Cet anticorps peut être par exemple produit après injection à des souris ou lapin de la protéine naturelle ou tout fragment, et/ou de la protéine recombinante ou tout fragment, et/ou de peptides définis et synthétisés à partir de la séquence protéique de la protéine. Les peptides immunogènes
20 utilisés pour la production d'anticorps monoclonaux anti-GM2 sont les peptides références SEQ ID N° 58, SEQ ID N° 59 et SEQ ID N° 60. Un anticorps capable de se fixer à la protéine Galgranuline B (SEQ ID N° 17) ou à tout fragment de cette protéine est décrit par Saintigny *et al.*, 1992 J Invest Dermatol 99 : 639-644 et Goebeler et al 1994 J Leukoc Biol 55 : 259-261, ou peut être produit en utilisant les méthodes
25 conventionnelles. Les peptides immunogènes pour la production d'anticorps monoclonaux anti-calgranuline B sont les peptides correspondant aux séquences SEQ ID N° 63, SEQ ID N° 64 et SEQ ID N° 65. Un anticorps capable de se fixer à la protéine mutée activatrice du GM2 (SEQ ID N°9) ou à tout fragment de cette protéine peut être produit en utilisant les méthodes conventionnelles définies ci dessus.

30 Par protéine naturelle et fragment, on entend toute protéine isolée, purifiée totalement ou partiellement obtenue à partir d'échantillon humain ou animal et tout fragment obtenu à partir de cette protéine. Par exemple, on obtient la protéine naturelle

correspondant à la saposine B (SEQ ID N° 24) en suivant la technique décrite par Waring et al. 1998 Mol Genet Metab 63 : 14-25 ; la protéine naturelle correspondant à la protéine activatrice du GM2 (SEQ ID N° 8) en suivant la technique décrite par DeGasperi et al., 1989 Biochem J 260 : 777-783, Vogel et al., 1987 Arch Biochem Biophys 259 : 627-638, Mitsuyama, 1983 Hokkaido Igaku Zasshi 58 : 502-512 ;
5 Hirabayashi et al 1983 J Neurochem 40 : 168-175, Conzelmann et al, 1979 Hoppe Seylers Z Physiol Chem 360 : 1837-1849, Li et al., 1976 J Biol Chem 251 : 1159-1163. La protéine naturelle correspondant à la calgranuline B (SEQ ID N° 17) est obtenue en suivant la technique décrite par Hitomi et al. 1996 J Cell Sci 109 : 805-815, Van den
10 Bos et al. 1998 Protein Expr Purif 13 : 313-318 et Raftery et al. 1996 Biochem J 316 : 285-293.

Par protéine recombinante ou fragment d'une protéine recombinante, on fait référence à toute protéine ou fragment de protéine produit dans une cellule procaryote ou eucaryote à partir d'une séquence nucléotidique codant pour la protéine
15 ou son fragment et transfectée dans la cellule, cette protéine ou son fragment étant ensuite purifiée. D'une manière générale, toute cellule issue d'un organisme procaryote ou eucaryote peut être utilisée dans le cadre de la présente invention, mais les cellules issues d'organismes eucaryotes sont préférées. On peut citer à titre d'exemple les cellules CHO, les cellules COS, les cellules Semliki. Aux fins de la présente invention,
20 ladite cellule peut être sauvage ou mutante. Par exemple, la protéine recombinante correspondant à la saposine B (SEQ ID N° 24) peut être obtenue en suivant les techniques décrites par Zaltash et al. 1998 Bebs letter 423 : 1-4 et Qi et al. 1994 J Biol Chem 269 : 16746-16753. Une telle protéine recombinante est au moins disponible auprès de Kase et al. 1996 Febs Lett 393 : 74-76. La protéine recombinante
25 correspondant à la protéine activatrice du GM2 (SEQ ID N° 8) peut être produite par les techniques décrites par Yuziuk et al. 1998 J Biol Chem 273 : 66-72 et Bierfreund et al., 1999 Neurochem Res 24 : 295-300. La protéine recombinante correspondant à la calgranuline B (SEQ ID N° 17) peut être obtenue selon le protocole de Longbottom et al. 1992 Biochim Biophys Acta 1120 : 215-222, Raftery et al. 1999 Protein Expr Purif
30 15 : 228-235. Une telle protéine recombinante est disponible au moins auprès de Klempt et al. 1997 Febs Letter 408 : 81-84.

Par séquence nucléotidique d'ADN ou fragment nucléotidique d'ADN codant pour tout ou partie de la protéine saposine B (SEQ ID N°24), on entend la séquence d'acides nucléiques SEQ ID N° 53 ou un fragment de cette séquence. Par séquence ou fragment nucléotidique ARN codant pour tout ou partie de la protéine saposine B (SEQ ID N° 24), on entend toute séquence déduite de la séquence d'ADN SEQ ID N° 53, en tenant compte du code génétique et des phénomènes d'épissage.

Par séquence nucléotidique d'ADN ou fragment nucléotidique d'ADN codant pour tout ou partie de la protéine activatrice du GM2 (SEQ ID N° 8), on entend la séquence d'acides nucléiques SEQ ID N° 31 ou un fragment de cette séquence. Par séquence ou fragment nucléotidique d'ARN codant pour tout ou partie de la protéine activatrice du GM2 (SEQ ID N° 8), on entend toute séquence déduite de la séquence ADN SEQ ID N° 31, en tenant compte du code génétique et des phénomènes d'épissage.

Par séquence nucléotidique d'ADN ou fragment nucléotidique d'ADN codant pour tout ou partie de la protéine calgranuline B (SEQ ID N° 17), on entend la séquence d'acides nucléiques SEQ ID N° 42 ou un fragment de cette séquence. Par séquence ou fragment nucléotidique d'ARN codant pour tout ou partie de la protéine calgranuline B (SEQ ID N° 17), on entend toute séquence déduite de la séquence ADN SEQ ID N° 42, en tenant compte du code génétique et des phénomènes d'épissage.

Par séquence ou fragment nucléotidique codant pour tout ou partie de la protéine mutée (SEQ ID N° 9), on entend la séquence d'acides nucléiques déduite de la séquence SEQ ID N° 9, en tenant compte du code génétique. Par séquence ou fragment nucléotidique ARN codant pour tout ou partie de cette protéine mutée B (SEQ ID N° 9), on entend toute séquence déduite de la séquence ADN, en tenant compte du code génétique et des phénomènes d'épissage.

Par activité protéique, on entend une fonction caractéristique biologique de la protéine. Cette activité protéique peut être mise en évidence par des techniques connues de l'homme de l'art. Par exemple, l'activité de la saposine B (SEQ ID N° 24) et des protéines de la famille de la saposine B (par exemple SEQ ID N° 25 à 29), peut être détectée par la mise en œuvre des protocoles décrits par Li et al., 1983, Am J Hum Genet 35 :629-634.; Li et al., 1988 J Biol Chem 263 : 6588-6591, Li et al., 1981 J Biol Chem 256 : 6234-6240 et Li et al., 1976 J Biol Chem 251 :1159. Par activité de la

protéine activatrice du GM2 (SEQ ID N° 8) et des protéines de la même famille (par exemple SEQ ID N° 10 à 16), on entend au moins l'activité détectée par la mise en œuvre des protocoles décrits par exemple par Kase et al., 1996, Febs Letters 393 : 74-76, Kishimoto et al., 1992, J Lipid Res 33 : 1255-1267 et O'Brien et al., 1991 Faseb J 5 : 301-308. Par activité de la calgranuline B (SEQ ID N° 17) et les protéines de la même famille de la calgranuline b (par exemple SEQ ID N° 18 à 23) et toute, on entend au moins l'activité détectée par la mise en œuvre des protocoles décrits par exemple par Murthy et al., 1993 J Immunol 151 : 6291-6301 et Murao et al., 1990 Cell growth Differ 1 : 447-454.

10 L'obtention d'un modèle animal transgénique, de préférence murin, pour une pathologie humaine est techniquement réalisable. Brièvement, l'animal transgénique est produit en utilisant les techniques conventionnelles décrites et possède intégré dans son génome les acides nucléiques codant pour les protéines ou leurs fragments.

15 Evaluation de l'efficacité d'un agent thérapeutique et suivi thérapeutique *ex vivo*, chez l'homme :

les agents thérapeutiques à tester pour une activité thérapeutique et/ou pour un suivi thérapeutique sont administrés par différentes voies à l'homme, telles que les voies intradermique, intraveineuse, intramusculaire, intracérébrale, orale, ou autres.

20 Différentes doses sont administrées à l'être humain. Le dossier clinique du patient au moment de la première administration est parfaitement connu. Une ou plusieurs administrations peuvent être réalisées avec des temps d'intervalle différents entre chaque administration pouvant aller de quelques jours à quelques années. Des échantillons biologiques sont prélevés à des intervalles de temps déterminés après

25 administration de l'agent thérapeutique, de préférence du sang, du sérum, du liquide céphalo-rachidien et de l'urine. Différentes analyses sont réalisées à partir de ces échantillons. Juste avant la première administration de l'agent thérapeutique, ces prélèvements et ces mêmes analyses sont également réalisés. Un examen clinique et biologique classique (IRM, bandes oligoclonales dans le liquide céphalo-rachidien,

30 potentiels évoqués) est réalisé également en parallèle des analyses supplémentaires qui sont être décrites ci dessous, à différentes temps de l'analyse. Les analyses réalisées sont :

- (i) une mesure de l'activité gliotoxique par le bio-essai à partir d'échantillons de sérum, de LCR et d'urine, et/ou
- (ii) une mesure d'activité des protéines d'intérêt identifiées dans la présente invention seules ou en combinaison comme décrit par exemple par : Li et al., 1983, Am J Hum Genet 35 :629-634 ; Li et al., 1988 J Biol Chem 263 : 6588-6591 ; Li et al., 1981 J Biol Chem 256 : 6234-6240 ; Li et al., 1976 J Biol Chem 251 :1159 ; Kase et al., 1996, FebsLetters 393 : 74-76 ; Kishimoto et al., 1992, J Lipid Res 33 : 1255-1267 ; O'Brien et al., 1991 Faseb J 5 : 301-308 ; Murthy et al., 1993 J Immunol 151 : 6291-6301 ; Murao et al., 1990 Cell growth Differ 1 : 447-454, et/ou
- (iii) un dosage des protéines d'intérêt ou de leurs fragments, seuls ou en combinaison, dans les échantillons de sang/sérum, LCR, urine par ELISA et/ou Western Blot, en utilisant des anticorps ou des fragments d'anticorps capables de se fixer à au moins une des protéines ou à un de leur fragment, et/ou
- (iv) un dosage d'anticorps spécifiques des protéines d'intérêt ou de leurs fragments dans des échantillons de sang/sérum, LCR, urine, par ELISA et/ou Western blot en utilisant une protéine naturelle ou un fragment de la protéine naturelle et/ou une protéine recombinante ou un fragment de cette protéine recombinante, seuls ou en combinaison. De même un dosage de ligands capables de se fixer aux protéines d'intérêt identifiées, seules ou en combinaison, peut être réalisé, et/ou
- (v) un dosage de la réponse immune cellulaire « helper » et/ou cytotoxique induite contre les protéines d'intérêt et tout peptide immunogène dérivant de ces protéines, par exemple en réalisant un test d'activation *in vitro* de cellules lymphocytes T spécifiques de l'antigène administré (exemple). Par exemple en réalisant un test d'activation *in vitro* de cellules lymphocytes T helper spécifiques de l'antigène administré (exemple) ; Par exemple en quantifiant les lymphocytes T cytotoxiques selon la technique dite ELISPOT décrite par Scheibenbogen et al., 1997 Clinical Cancer Research 3 : 221-226. Une telle détermination est particulièrement avantageuse lorsque l'on souhaite évaluer l'efficacité d'une approche vaccinale mise en œuvre chez un patient donné ou pour diagnostiquer un état pathologique potentiel chez un patient en cherchant à mettre en évidence une réponse immune naturellement développée par ledit patient contre l'antigène les protéines d'intérêt ou tout fragment immunogène dérivés de ces protéines, seuls ou en combinaison, et/ou
- (vi) une détection de fragments d'ADN et/ou d'ARN codant pour les protéines ou un fragment des protéines d'intérêt par hybridation nucléotidique selon les techniques bien

connues de l'homme de l'art (Southern blot, Northern blot, ELOSA " Enzyme-Linked Oligosorbent Assay " (Katz JB et al., Am. J. Vet. Res., 1993 Dec ; 54 (12) :2021-6 et François Mallet et al., Journal of Clinical Microbiology, June 1993, p1444-1449)) et/ou par méthode d'amplification de l'ADN et/ou l'ARN , par exemple par PCR, RT-PCR, en utilisant des fragments d'acides nucléiques codant pour la séquence des protéines d'intérêt, et/ou

(vii) par biopsie de tissus, de préférence du cerveau, et l'observation des effets caractéristiques des protéines actives associées à la fraction gliotoxique, c'est à dire une apoptose des cellules gliales et/ou l'ouverture de la barrière hémato-encéphalique et/ou l'observation de phénomènes de démyélinisation, et/ou

(viii) par biopsie de tissus ou sur cellules circulantes (sang, LCR), l'observation de la présence des protéines d'intérêt et l'estimation de leur expression par observation immunohistologique sur des coupes histologiques réalisées à partir des tissus, en utilisant des ligands et/ou des anticorps ou leurs fragments capables de se fixer aux protéines d'intérêt, et/ou

(ix) par biopsie de tissus ou sur cellules circulantes (sang, LCR), l'observation de l'expression des protéines d'intérêt par hybridation in situ des molécules d'ARN codant pour les protéines d'intérêt en utilisant des acides nucléiques définis à partir des séquences des protéines d'intérêt, et/ou

(x) par biopsie de tissus ou sur cellules circulantes (sang, LCR), la détermination de l'expression des protéines d'intérêt par amplification de ces ARN par des techniques classiques, comme par exemple, la RT-PCR, en utilisant des acides nucléiques définis à partir des séquences des protéines d'intérêt.

On désigne par « polypeptides et/ou protéines d'intérêt de l'invention » le fragment C-terminal du perlecan (SEQ ID N°2), le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol (SEQ ID N°4), la protéine activateur du GM2 (SEQ ID N° 8), la protéine mutée de l'activateur du GM2 (SEQ ID N° 9), la calgranuline B (SEQ ID N° 17), la saposine B (SEQ ID N° 24), les protéines ou fragments appartenant à la famille du précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol (par exemple SEQ ID N° 5 à 7), les protéines ou fragments appartenant à la famille de la protéine activateur du GM2 (par exemple SEQ ID N° 10 à 16), les protéines ou fragments appartenant à la famille de la protéine calgranuline B (par exemple SEQ ID N° 18 à

23), les protéines ou fragments appartenant à la famille de la protéine saposine B (par exemple SEQ ID N° 25 à 29), et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29.

5 On désigne par séquence d'acides nucléiques ADN ou fragments codant pour les 'polypeptides et/ou protéines d'intérêt de l'invention' la séquence d'acides nucléiques codant pour le fragment C-terminal du perlecan (SEQ ID N°2), la séquence d'acides nucléiques codant pour le précurseur de la protéine plasmique de liaison au rétinol (SEQ ID N°4), la séquence d'acides nucléiques (SEQ ID N° 31) codant pour la
10 protéine activateur du GM2 (SEQ ID N° 8), la séquence d'acides nucléiques codant pour la protéine mutée de l'activateur du GM2 (SEQ ID N° 9), la séquence d'acides nucléique (SEQ ID N° 42) codant pour la calgranuline B (SEQ ID N° 17), la séquence d'acides nucléiques (SEQ ID N°53) codant pour la saposine B (SEQ ID N° 24), les
15 protéines ou fragments appartenant à la famille du précurseur de la protéine plasmique de liaison au rétinol (par exemple SEQ ID N° 5 à 7), les protéines ou fragments appartenant à la famille de la protéine activateur du GM2 (par exemple SEQ ID N° 10 à 16), les protéines ou fragments appartenant à la famille de la protéine calgranuline B (par exemple SEQ ID N° 18 à 23), les protéines ou fragments
20 appartenant à la famille de la protéine saposine B (par exemple SEQ ID N° 25 à 29).

 Une protéine ou un variant d'une protéine choisie plus particulièrement parmi les séquences définies dans les identificateurs SEQ ID N°s 2, 4, 8, 9, 17 et 24 ou leurs fragments, ou parmi les séquences correspondant aux protéines des familles de ces dites séquences (par exemple SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ
25 ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 24, SEQ ID N° 25 à 29), et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, indépendamment ou en combinaison, présente un effet toxique directement ou indirectement, vis à vis de cellules, en particulier vis à vis des
30 cellules gliales, qui est mis en évidence par le bio-essai précité. Les auto-anticorps produits en réponse à la présence de cette protéine ou de ces protéines sont associés au processus auto-immun. Ainsi, la cible du ou des agent(s) thérapeutique(s) est par

exemple (i) la protéine naturelle ou les protéines naturelles ou leurs variants dans le but de réguler leur expression et/ou leur concentration intracellulaire et/ou leur concentration dans la circulation, (ii) un anticorps spécifique d'au moins une telle protéine. L'agent thérapeutique ou les agents thérapeutiques définis éliminent la cible
5 directement, par induction d'une réponse immune spécifique et/ou la neutralisent.

La présente invention concerne donc un matériel biologique pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement de mammifères atteints de pathologies dégénérative et/ou auto-immune et/ou neurologique, de préférence la sclérose en plaques, ladite composition comprenant :

10 (i) soit au moins une protéine naturelle et/ou une protéine recombinante ou leurs fragments dont la séquence correspond à tout ou partie des séquences référencées SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17 et 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisie parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de
15 l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29), et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29,
20 indépendamment ou en combinaison,

(ii) soit au moins un ligand spécifique d'au moins une desdites protéines ou leurs fragments dont la séquence correspond à tout ou partie des séquences référencées SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17 et 24, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisie
25 parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29), et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au
30 moins 98 d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, indépendamment ou en combinaison,

(iii) soit au moins un anticorps polyclonal ou monoclonal spécifique d'au moins une desdites protéines ou leurs fragments dont la séquence correspond à tout ou partie des séquences référencées SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17 et 24, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29), et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et
5
10
avantageusement au moins 98 d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, indépendamment ou en combinaison,

(iv) soit au moins une séquence d'acide nucléique comprenant au moins un gène d'intérêt thérapeutique dont la séquence nucléique est déduite des séquences d'ADN et d'ARN codant pour tout ou partie des protéines dont les séquences sont
15
référencées SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17 et 24, et les séquences d'ADN et/ou ARN (par exemple SEQ ID N° 30 à 57) codant pour tout ou partie des protéines appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du GM2, de la calgranuline B et de la saposine B, en association avec des éléments assurant
20
l'expression dudit gène d'intérêt thérapeutique *in vivo* dans des cellules cibles destinées à être génétiquement modifiées par la séquence nucléique du gène d'intérêt thérapeutique,

(v) soit au moins une cellule de mammifère ne produisant pas naturellement la protéine d'intérêt ou les protéines d'intérêt ou tout fragment de cette
25
ou de ces protéine(s) ou des anticorps spécifiques d'au moins une desdites protéines ou de ses fragments ladite cellule mammifère étant génétiquement modifiée *in vitro* par au moins une séquence d'acide nucléique ou un fragment d'une séquence d'acide nucléique ou une association de séquences d'acides nucléiques correspondant à des fragments d'acides nucléiques issus d'un même gène ou de gènes différents, la ou
30
lesdites séquences nucléiques étant déduite(s) des séquences d'ADN et ARN codant pour les protéines référencées SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17 et 24, et les séquences d'ADN et/ou ARN (par exemple SEQ ID N° 30 à 57) codant pour tout ou partie des protéines

appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du GM2, de la calgranuline B et de la saposine B, ledit gène d'intérêt thérapeutique codant pour tout ou partie de la protéine d'intérêt, d'un fragment de la protéine d'intérêt ou d'un anticorps spécifique de la protéine d'intérêt qui sera exprimé à la surface de ladite cellule de mammifère (Toes et al., 1997, PNAS 94 : 14660-14665). La composition pharmaceutique peut contenir un agent thérapeutique seul dirigé contre une cible seule ou des agents pris en combinaison dirigés contre plusieurs cibles.

On désigne par « polypeptides et/ou protéines d'intérêt de l'invention » le fragment C-terminal du perlecan (SEQ ID N° 2), le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol (SEQ ID N° 4), la protéine activateur du GM2 (SEQ ID N° 8), la protéine mutée de l'activateur du GM2 (SEQ ID N° 9), la calgranuline B (SEQ ID N° 17), la saposine B (SEQ ID N° 24), les protéines ou fragments appartenant à la famille du précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol (par exemple SEQ ID N° 5 à 7), les protéines ou fragments appartenant à la famille de la protéine activateur du GM2 (par exemple SEQ ID N° 10 à 16), les protéines ou fragments appartenant à la famille de la protéine calgranuline B (par exemple SEQ ID N° 18 à 23), les protéines ou fragments appartenant à la famille de la protéine saposine B (par exemple SEQ ID N° 25 à 29 et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29.

A partir des connaissances des séquences en acides aminés des protéines d'intérêt identifiées dans la présente invention, il est à la portée de l'homme de l'art de définir et utiliser les molécules décrites ci dessus et/ou toute molécule capable de se fixer au dites molécules, et/ou toute molécule capable d'inhiber lesdites molécules. Ainsi la présente invention concerne l'utilisation de protéines naturelles et/ou recombinantes et/ou de polypeptides de synthèse et leurs fragments, de ligand capables de se fixer au dites protéines ou à leur(s) fragment(s), par exemple des anticorps ; de protéines inhibitrices de la fonction et/ou de l'expression et/ou de la fixation desdites protéines.

Utilisation de protéine(s) et/ou peptide(s) naturel(s) et/ou de protéine(s) recombinante(s) et/ou de polypeptide(s) de synthèse correspondant aux protéines d'intérêt identifiées dans la présente invention.

La présente invention concerne un matériel biologique pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinées au traitement de mammifères atteint de maladie auto-immune, de préférence la sclérose en plaques, comprenant :

(i) soit au moins une protéine naturelle et/ou une protéine recombinante et/ou un polypeptide de synthèse choisi parmi les protéines dont les séquences en acides aminés sont référencées SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17 et 24, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29), et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, seules ou en combinaison,

(ii) soit au moins un fragment naturel et/ou synthétique de ces protéines d'intérêt, par exemple un fragment immunogène capable d'induire une réponse immune contre un polypeptide cible,

(iii) soit au moins un peptide mimotope défini à partir des séquences de référence SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17 et 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29), et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, ou une combinaison de mimotopes, capable d'induire une réponse immune contre le polypeptide cible,

(iv) soit au moins toute protéine ou peptide pouvant réguler *in vivo* la transcription et/ou la traduction des protéines d'intérêt (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17 et 24) et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmaticque de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29. L'administration de ces protéines et/ou peptides seuls ou en combinaison peut rétablir la concentration d'une protéine d'intérêt dans l'organisme.

La réponse immune dirigée contre un antigène spécifique peut être divisée en deux catégories distinctes, l'une mettant en jeu les anticorps (réponse immune de type humorale), l'autre les cellules effectrices cytotoxiques telles que par exemple les macrophages, les lymphocytes cytotoxiques (CTL) ou les cellules tueuses (NK) ainsi que les lymphocytes T « helper », notamment les lymphocytes T CD4+ (réponse immune de type cellulaire). Plus particulièrement, les deux types de réponse se distinguent en ce que les anticorps reconnaissent les antigènes sous leur forme tridimensionnelle alors que les lymphocytes T, par exemple, reconnaissent des portions peptidiques desdits antigènes, associés à des glycoprotéines codées par les gènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), notamment les gènes du complexe majeur d'histocompatibilité de type I qui sont exprimés de façon ubiquitaire à la surface des cellules ou les gènes du complexe majeur d'histocompatibilité de type II qui sont exprimés de façon spécifique à la surface des cellules impliquées dans la présentation des antigènes (APC). 1) Selon un premier aspect, la réponse immune de type cellulaire est caractérisée en ce que les cellules T de type CD4+ (cellules T helper), suite à un phénomène d'activation bien connu (pour une revue voir Alberola-lia 1997, Annu Rev Immunol 15, 125-154) produisent des cytokines qui à leur tour induisent la prolifération de cellules APC capables de produire lesdites cytokines, la différenciation cellulaire des lymphocytes B capables de produire des anticorps spécifiques de l'antigène, et la stimulation des lymphocytes T cytotoxiques (CTL). 2)

Selon un second aspect de la réponse immune cellulaire, les cellules effectrices cytotoxiques telles que par exemple les lymphocytes de type CD8+ (CTL) sont activés a) après interaction avec des peptides antigéniques fixés sur et présentés par les glycoprotéines portées par les cellules ubiquitaires et codées par les gènes appartenant au système CMHI, et b) éventuellement par les cytokines produites par les CD4+.

La présente invention concerne l'administration d'une protéine ou d'un peptide dérivés des protéines d'intérêt (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17 et 24) ou de leur(s) fragment(s), et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29), et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, seuls ou en combinaison, pour la prophylaxie et/ou la thérapie d'une maladie auto-immune, telle que la sclérose en plaques. Ces protéines et peptides administrés sont caractérisés en ce que ils doivent avoir perdu leur activité toxique, par exemple leur activité gliotoxique, ou avoir perdu leur capacité à se fixer à un ligand, et peuvent induire significativement une réponse immune médiée par les lymphocytes T ou/et les anticorps dirigée contre cette protéine sont utilisés. De telles protéines sont dites 'modifiées', cependant leur immunogénicité est conservée. De telles molécules immunogéniques modifiées sont obtenues par un nombre de traitements conventionnels, par exemple la dénaturation chimique ou à la chaleur, la troncation ou la mutation avec délétion, insertion ou emplacement d'acides aminés. Un exemple de troncation consiste en la troncation d'acides aminés à l'extrémité carboxy-terminale pouvant aller jusqu'à 5-30 acides aminés. Les molécules modifiées peuvent être obtenues par des techniques synthétiques ou/et recombinantes ou par des traitements chimiques ou physiques des molécules naturelles.

Les protéines d'intérêt naturelles et/ou recombinantes identifiées dans la présente invention (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17 et 25), et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies

parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29), et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, ou leur(s) fragment(s), sont utilisées en vaccination prophylactique et thérapeutique contre les maladies auto-immunes, de préférence la SEP. Un vaccin comprend une quantité immunogénique effective de la protéine immunogène en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable et éventuellement un adjuvant et/ou un diluant. Les véhicules, adjuvants et diluants pharmaceutiquement acceptables sont bien connus de l'homme du métier. On peut citer à titre de référence le Remington's Pharmaceutical Sciences. L'utilisation de compositions vaccinales est particulièrement avantageuse en association avec un diagnostic précoce de la maladie. La protéine immunogène est utilisée dans la préparation de médicament pour la vaccination prophylactique ou thérapeutique. Les protéines d'intérêt peuvent être éliminées de l'organisme sans induire d'effets secondaires indésirables. L'identification de telles protéines ou peptides vaccins est réalisée comme suit : les molécules candidates modifiées comme décrit précédemment (protéines naturelles, recombinantes, peptides) sont analysées dans un test fonctionnel pour vérifier qu'elles ont perdues leur toxicité, par exemple leur activité gliotoxique en utilisant le test appelé bio-essai, et pour vérifier leur immunogénicité (i) en réalisant un test *in vitro* de prolifération de lymphocytes T CD4+ spécifiques de l'antigène administré (T cell assay) ou un test *in vitro* de cytotoxicité des lymphocytes CD8+ spécifiques de l'antigène administré et (ii) en mesurant entre autre le taux d'anticorps circulants dirigés contre la protéine naturelle. Ces formes modifiées sont utilisées pour immuniser des hommes par des procédures standard avec des adjuvants appropriés.

Les vaccins préparés sont injectables, c'est-à-dire en solution liquide ou en suspension. En option, la préparation peut aussi être émulsifiée. La molécule antigénique peut être mélangée avec des excipients qui sont pharmaceutiquement acceptables et compatibles avec l'ingrédient actif. Des exemples d'excipients favorables sont l'eau, une solution saline, le dextrose, le glycérol, l'éthanol ou des

équivalents et leurs combinaisons. Si désiré, le vaccin peut contenir des quantités mineures de substances auxiliaires comme des agents "wetting" ou émulsifiants, des agents qui tamponnent le pH ou des adjuvants comme l'hydroxide d'aluminium, le dipeptide muramyl ou leurs variations. Dans le cas des peptides, leur couplage à une
5 plus grosse molécule (KLH, toxine tétanique) augmente quelquefois l'immunogénicité. Les vaccins sont administrés conventionnellement par injection par exemple sous cutanée ou intramusculaire. Des formulations additionnelles favorables avec d'autres modes d'administration incluent des suppositoires et quelquefois des formulations orales.

10 En général la concentration du polynucléotide dans la composition utilisée pour une administration *in vivo* est de 0.1µg /ml jusqu'à 20 mg /ml. Le polynucléotide peut être homologue ou hétérologue de la cellule cible dans laquelle il va être introduit.

La présente invention concerne également l'utilisation de vaccins incluant des molécules d'acides nucléiques qui codent pour les protéines d'intérêt ou des
15 peptides immunogènes ou leur fragment(s), non actifs, correspondant aux protéines d'intérêt (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17 et 24) et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par
20 exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29. Les vaccins d'acides nucléiques, en particulier les vaccins ADN, sont administrés
25 généralement en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable en injection intramusculaire.

A partir de la séquence en acides aminés des protéines d'intérêt décrites (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17 et 24) et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le
30 précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23,

SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, des peptides ou des fragments correspondant à tout ou partie de la séquence primaire de ces protéines peuvent être synthétisés par des méthodes classiques de synthèse peptidique ou obtenus par recombinaison génétique.

Des protéines recombinantes correspondante aux protéines d'intérêt, produites dans un système cellulaire procaryote ou eucaryote, sont disponibles auprès de différentes équipes et sont décrites dans la littérature. Elles peuvent être également produite par l'homme du métier à partir de la connaissance des séquences des gènes correspondants décrits dans la littérature et en tenant compte de la dégénérescence du code génétique. Toutes les séquences protéiques identifiées dans la présente invention sont ainsi susceptibles d'être obtenues par recombinaison génétique. Les gènes sont clonés dans des vecteurs adaptés. Des vecteurs différents sont utilisés pour transformer des cellules procaryotes (par exemple *E. coli*) et des cellules eucaryotes (par exemple cellules COS, CHO et cellules Simliki). Les protéines recombinantes correspondant aux protéines d'intérêt ou à des fragments des protéines d'intérêt peuvent être ainsi produits dans des systèmes cellulaires procaryotes et/ou encaryotes. Dans les cellules *E. coli*, les protéines recombinantes sont produites avec une queue poly-histidine. La fraction protéique insoluble est solubilisée dans de l'urée 8M. L'enrichissement du produit a été effectué sur résine chélatée au nickel (Qiagen). La colonne a été lavée avec des concentrations décroissantes d'urée. L'élution a été faite avec de l'imidazole en l'absence d'urée. La séquence complète des protéines d'intérêt peut être également clonée dans un plasmide adapté puis transférée dans le virus de la vaccine pour obtenir un virus recombinant.

Utilisation de ligands capables de se fixer aux protéines d'intérêt identifiées dans la présente invention.

La présente invention concerne un matériel biologique pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinées au traitement de mammifères atteint de maladie auto-immune, de préférence la sclérose en plaques, comprenant :

(i) soit au moins un ligand capable de se fixer aux protéines et/ou fragments des protéines choisies parmi les protéines cibles SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 14 et

24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, le ligand étant capable ou non d'inhiber l'activité protéique,

10 (ii) soit au moins un anticorps polyclonal ou monoclonal capable de se fixer à au moins une protéine ou un de ses fragments choisie parmi les protéines cibles SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 14 et 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple
15 SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29. Cet
20 anticorps peut être ou non neutralisant, c'est-à-dire capable ou non d'inhiber l'activité de la protéine d'intérêt. Le ligand peut être choisi parmi toute molécule ou fragment molécule capable de se fixer aux protéines cibles, par exemple les récepteurs de ce protéines, les cofacteurs de ces protéines, les anticorps polyclonaux ou monoclonaux capables de se fixer aux protéines ou tout fragment de ces protéines.

25 Ces anticorps sont très utiles notamment pour permettent la mise en œuvre de compositions thérapeutiques car ils conduisent par exemple, à des réactions immunes, dirigées spécifiquement à l'encontre d'épitopes immunodominants ou contre des antigènes présentant une grande variabilité. On administre chez le patient soit des anticorps solubles neutralisants pour inhiber leur fonction, soit des anticorps solubles
30 spécifiques pour éliminer le peptide par formation de complexes immuns. L'invention décrit l'utilisation d'anticorps capables de reconnaître spécifiquement au moins une protéine décrite dans la présente invention pour le traitement et /ou pour le suivi

thérapeutique de maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, de préférence la sclérose en plaques. Ces anticorps sont polyclonaux et de préférence monoclonaux. De préférence ces anticorps reconnaissent le site actif de la protéine et en se fixant, inhibe la fonction de la protéine. La capacité de l'anticorps à se fixer spécifiquement à la protéine est analysé par des techniques conventionnelle décrites, comme par exemple par des tests ELISA ou de Western blot en utilisant la protéine ou le peptide immunogène naturel ou synthétique. Le titre de l'anticorps est déterminé. La capacité de l'anticorps à neutraliser la fonction de la protéine peut être analysée par différents moyen, par exemple en déterminant la diminution de l'activité de la protéine ou du peptide immunogène en présence de l'anticorps, de préférence en déterminant la diminution de l'activité gliotoxique en utilisant le test bio-essai *in vitro*.

Par exemple, les anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine cible ou une partie de cette protéine sont produits par des techniques conventionnelles utilisées pour produire des anticorps contre des antigènes de surface. Des souris ou des lapins sont immunisées (i) soit avec la protéine naturelle ou recombinante d'intérêt, (ii) soit avec tout peptide immunogène de cette protéine d'intérêt, (iii) soit avec des cellules murines qui expriment la protéine ou le peptide d'intérêt et les molécules du CMHII. La lignée murine Balb/c est la plus fréquemment utilisée. L'immunogène est également un peptide choisi parmi les peptides définis à partir des séquences primaires des protéines d'intérêt. Par exemple, l'immunogène suivant a été préparé : les peptides SEQ ID N°s 58, 59, 60 issus de la séquence du précurseur du ganglioside GM2, les peptides SEQ ID N°s 61, 62 issus de la séquence de la saposine B et les peptides SEQ ID N°s 63, 64, 65 issus de la calgranuline B ont été couplé à de l'hémocyanine de Lymphet Keyhole, en abrégé peptide-KLH, comme support pour son utilisation en immunisation, ou couplé à de l'albumine de sérique humaine, en abrégé peptide-HSA. Les animaux ont été soumis à une injection de peptide-KLH ou de peptide-HSA en utilisant de l'adjuvant complet de Freund (IFA). Les sérums et les surnageants de culture d'hybridome issus des animaux immunisés avec chaque peptide ont été analysés pour la présence d'anticorps anti-protéines par un test ELISA utilisant les protéines initiales. Les cellules spléniques de ces souris ont par conséquent été récupérées et fusionnées avec des cellules de myélome. Le polyéthylèneglycol (PEG) est l'agent de fusion le plus fréquemment utilisé. Les hybridomes produisant les

anticorps les plus spécifiques et les plus sensibles sont sélectionnés. Les anticorps monoclonaux peuvent être produits *in vitro* par culture cellulaire des hybridomes produits ou par récupération de liquide d'ascite murin après injection intrapéritonéale des hybridomes chez la souris. Quel que soit le mode de production en surnageant ou en ascite, il importe ensuite de purifier l'anticorps monoclonal. Les méthodes de purification utilisées sont essentiellement la filtration sur gel échangeur d'ions ou par chromatographie d'exclusion, voire l'immunoprécipitation. Pour chaque anticorps il faut choisir la méthode qui permettra d'obtenir le meilleur rendement. Un nombre suffisant d'anticorps anti-protéines sont criblés dans des tests fonctionnels pour identifier les anticorps les plus performants pour fixer la protéine d'intérêt et/ou pour bloquer l'activité de la protéine d'intérêt. Les anticorps monoclonaux sélectionnés sont humanisés par des méthodes standard de « CDR grafting » (protocole réalisé par de nombreuses compagnies, sous forme de service). Ces anticorps humanisés peuvent être testés cliniquement chez le patient. L'efficacité de ces anticorps peut être suivie par des paramètres cliniques.

La production *in vitro* d'anticorps, de fragments d'anticorps ou de dérivés d'anticorps, tels que les anticorps chimères, produits par génie génétique, dans des cellules eucaryotes a été décrite (EP 120 694 ou EP 125 023) et est aussi applicable à la présente invention.

Utilisation de molécules inhibitrices des protéines d'intérêt identifiées dans la présente invention.

La présente invention concerne un matériel biologique pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinées au traitement de mammifères atteint de maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, de préférence la sclérose en plaques, ladite composition comprenant (i) soit au moins une molécule inhibitrice de la fonction d'au moins une protéine choisie parmi les protéines identifiées dans la présente invention (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24) et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au

moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, par exemple inhibitrice de l'activité gliotoxique, (ii) soit au moins une molécule régulatrice de l'expression d'au moins une protéine choisie parmi les protéines SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, par exemple pour bloquer la transcription ou la traduction, (iii) soit au moins une molécule régulatrice du métabolisme d'au moins une protéine choisie parmi les protéines SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, (iv) soit au moins une molécule régulatrice de l'expression et/ou du métabolisme d'un ligand d'au moins une protéine choisie parmi les protéines SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à SEQ ID N° 8 et SEQ ID N° 10 à 29 et les séquences peptidiques qui présentent au

moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, par exemple un récepteur ou un cofacteur. On peut penser que ces protéines de l'organisme humain peuvent être inhibées sans effet secondaire.

5 Un autre aspect important de l'invention concerne l'identification et l'évaluation de l'efficacité thérapeutique de substances naturelles et/ou synthétiques (i) capables de bloquer et/ou d'inhiber l'activité des protéines d'intérêt de l'invention et/ou de leur fragment : SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies
10 parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au
15 moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29 et/ou (ii) capables d'inhiber leur métabolisme tels les inhibiteurs du métabolisme correspondant, les inhibiteurs d'enzymes activées par les coenzymes, (iii) capables de réguler l'expression des protéines d'intérêt (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même
20 famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 %
25 d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, (iv) capables d'inhiber la fonction et/ou l'expression des ligands des protéines d'intérêt SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même
30 famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences

peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, comme par exemple des récepteurs. Ces substances peuvent être utilisées dans des traitements prophylactiques et thérapeutiques de la maladie. L'invention concerne également des méthodes pour traiter et prévenir une maladie auto-immune, par exemple la SEP, en administrant des quantités effectives de ces substances. Les substances peuvent être des protéines, des anticorps, de petites molécules synthétiques ou naturelles, des dérivés des protéines identifiées dans cette invention, des lipides, des glycolipides etc... Les petites molécules peuvent être criblées et identifiées en grande quantité en utilisant des bibliothèques combinatoires chimiques. L'invention concerne également des compositions pharmaceutiques comprenant ces substances en association avec des carriers physiologiques acceptables, et des méthodes pour la préparation de médicaments à utiliser en thérapie ou en prévention de maladies auto-immunes dont la SEP en utilisant ces substances.

Pour identifier des molécules inhibitrices de faible poids moléculaire comme des drogues candidates pour les maladies dégénératives et/ou neurologiques et/ou auto-immunes, telles que la sclérose en plaques, on utilise les tests et protocoles décrits dans précédemment et dans les demandes de brevet incorporés à titre de référence, en utilisant des échantillons prélevés du patient non traité ou traité, du modèle animal non traité ou traité, ou de tissus du modèle animal non traité ou traité. Cet aspect de l'invention inclue également un procédé pour identifier des substances capables de bloquer ou d'inhiber l'activité des protéines d'intérêt, comprenant l'introduction de ces substances dans un test *in vitro* ou dans un modèle animal *in vivo*. Les molécules sélectionnées sont testées à différentes concentrations. Ces inhibiteurs sont aussi testés dans des essais de toxicité et pharmacocinétique pour savoir si ils peuvent représenter des drogues candidates valables. Les substances testées pour l'inhibition ou le blocage des activités protéiques ou de l'expression des protéines, dans ces procédures de criblage peuvent être des protéines, des anticorps, des fragments d'anticorps, de petites molécules synthétiques ou naturelles, des dérivés des protéines d'intérêt, etc Les petites molécules peuvent être criblées et identifiées en grande quantité en utilisant des bibliothèques combinatoires chimiques.

A titre d'exemple, on peut citer comme substances inhibitrices :

Les inhibiteurs des protéines identifiées dans la présente invention (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24), les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatiche de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et les inhibiteurs des fragments desdites protéines. Ces inhibiteurs peuvent être compris dans une composition prophylactique et thérapeutique, en particulier pour le traitement de la sclérose en plaques. Par exemple, la lycorine, alcaloïde extrait de Amaryllidaceae (ex : *Crinum Asiaticum*) est utilisée *in vitro* à une concentration comprise entre 0.1 et 0.5 µg /ml et *in vivo* à une concentration comprise entre 0.1 et 1 mg / kg /jour. Par exemple, le Rolipram (nom commercial) et l'Ibudilast (nom commercial), qui sont deux molécules de la même famille des inhibiteurs des phosphodiesterases 4(PDE4) sont utilisées *in vitro* à des concentrations comprises entre 1 et 10 µM/l et *in vivo* à des concentrations comprises entre environ 10 mg/kg/jour.

☛ A partir des séquences d'acides aminés des protéines SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24 et des séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatiche de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29), il est évident que l'on peut déduire les séquences nucléotidiques ADN et ARN (SEQ ID N° 30, 31, 42, 53) correspondant aux protéines d'intérêt et les séquences codant pour les protéines de la famille de ces protéines d'intérêt (par exemple SEQ ID N° 32 à 41, SEQ ID N° 43 à 52, SEQ ID N° 54 à 57, SEQ ID N° 66 à 67), en tenant compte du code génétique et de sa dégénérescence. Ainsi la présente invention concerne l'utilisation de ces séquences nucléotidiques sous forme :

- de séquences anti-sens,
- de séquences codant pour un gène thérapeutique,

- de séquences pouvant être contenue dans un vecteur pour la réalisation de transformation cellulaire ex vitro et/ou in vivo (thérapie génique).

Utilisation d'acides nucléiques déduits des séquences en acides aminés des protéines d'intérêt identifiées dans la présente invention ; acides nucléiques anti-sens et/ou codant pour un gène thérapeutique.

La présente invention concerne un matériel biologique pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinées au traitement de mammifères atteint de maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, en particulier la sclérose en plaques, la composition comprenant (i) soit au moins une séquence d'acide nucléique capable de s'hybrider à une séquence d'acides nucléiques codant pour les protéines d'intérêt (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24) et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, ou leur(s) fragment(s), (ii) soit au moins une séquence d'acide nucléique comprenant au moins un gène d'intérêt thérapeutique codant pour les protéines ou un fragment de protéines (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24), les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et des éléments assurant l'expression dudit gène *in vivo* dans des cellules cibles destinées à être génétiquement modifiées par ladite séquence nucléique.

Par séquence d'acide nucléique, on entend un fragment d'ADN et/ou d'ARN, double brin ou simple brin, linéaire ou circulaire, naturel et isolé ou de

synthèse, désignant un enchaînement précis de nucléotides, modifiés ou non, permettant de définir un fragment ou une région d'un acide nucléique choisi dans le groupe consistant en un ADNc ; un ADN génomique ; un ADN plasmidique ; un ARN messenger. Ces séquences d'acides nucléiques sont déduites de la séquence d'acides aminés des protéines SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, en utilisant le code génétique. En raison de la dégénérescence du code génétique l'invention englobe également des séquences équivalentes ou homologues. Ces séquences définies permettent à l'homme de l'art de définir lui-même les acides nucléiques adaptés.

Aussi, la présente invention concerne un matériel biologique pour la préparation de compositions pharmaceutiques comprenant au moins une séquence d'acide nucléique capable de s'hybrider à une séquence d'acides nucléiques codant pour les protéines d'intérêt ou leur(s) fragment(s) (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24) et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29.

L'invention consiste à définir et utiliser des molécules d'acides nucléiques complémentaires des séquences ADN et/ou ARN codant pour les protéines d'intérêt ou leur(s) fragment(s). Ces fragments correspondent à des molécules anti-sens ou ribozyme et peuvent être synthétisés à l'aide de synthétiseurs automatiques, tels que

ceux commercialisés par la société Applied Biosystem. L'invention décrit l'utilisation de ces acides nucléiques capables de s'hybrider dans des conditions stringentes à l'ADN ou/et ARN codant pour les protéines de l'invention ou pour leu(s) fragment(s). Des conditions de stringence caractéristiques sont celles qui correspondent à une
5 combinaison de la température et de la concentration saline choisie approximativement entre 12 à 20°C sous le Tm (« melting temperature ») de l'hybride à l'étude. De telles molécules sont synthétisées et peuvent être marquées en utilisant des méthodes de marquage conventionnelles utilisées pour les sondes moléculaires, ou peuvent être utilisées comme amorces dans les réactions d'amplification. Les séquences qui
10 présentent au moins 90% d'homologie par rapport à une séquence de référence font également partie de l'invention, de même que les fragments de ces séquences qui présentent au moins 20 nucléotides et de préférence 30 nucléotides contigus homologues par rapport à une séquence de référence. Afin de réduire la proportion de peptides naturels ou variants, il est possible d'envisager une approche anti-sens et/ou
15 ribozyme. Une telle approche est largement décrite dans la littérature. Bien entendu, de telles molécules anti-sens peuvent constituer en tant que telles des vecteurs. On peut également utiliser des vecteurs qui comprennent une séquence d'acides nucléique qui code pour un anti-sens.

La présente invention concerne un matériel biologique pour la préparation
20 de compositions pharmaceutiques destinées au traitement de mammifères atteint de maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, telle que la sclérose en plaques, ladite composition comprenant au moins une séquence d'acide nucléique contenant au moins un gène d'intérêt thérapeutique et des éléments assurant l'expression dudit gène *in vivo* dans des cellules cibles destinées à être génétiquement
25 modifiées par ladite séquence nucléique.

Ces séquences d'acides nucléiques et/ou vecteurs (anti-sens ou codant pour une protéine ou un fragment d'une protéine) permettent de cibler les cellules dans lesquelles le peptide est exprimé, telles que les cellules macrophages : (i) soit par l'utilisation d'une molécule de ciblage introduite sur le vecteur, (ii) soit par l'utilisation
30 d'une propriété particulière de ces cellules.

Utilisation de vecteurs comprenant un gène d'intérêt thérapeutique correspondant aux gènes des protéine d'intérêt identifiées dans la présente invention.

La présente invention concerne un matériel biologique pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinées à la prévention et au traitement de maladies dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, telles que la sclérose en plaques, la composition comprenant une séquence d'acide nucléique comprenant un gène d'intérêt thérapeutique et des éléments d'expression dudit gène d'intérêt. Les gènes peuvent être non mutés ou mutés. Ils peuvent également consister en des acides nucléiques modifiés de sorte qu'il ne leur est pas possible de s'intégrer dans le génome de la cellule cible ou des acides nucléiques stabilisés à l'aide d'agents, tels que la spermine.

Un tel gène d'intérêt thérapeutique code notamment :

(i) soit au moins pour une protéine choisie parmi les protéines identifiées dans la présente invention (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24) et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, ou leur(s) fragment(s),

(ii) soit au moins pour tout ou partie d'un anticorps polyclonal ou monoclonal capable de se fixer à au moins une protéine ou un fragment de protéine choisi parmi les protéines identifiées dans la présente invention (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24) et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29. Il peut notamment s'agir d'anticorps transmembranaire natif, ou de fragment ou dérivé d'un tel anticorps, pour autant que

ledit anticorps, fragment ou dérivé d'anticorps soit exprimé à la surface de la cellule cible du mammifère génétiquement modifiée et soit capable de se fixer à un polypeptide présent à la surface d'une cellule effectrice cytotoxique ou d'un lymphocyte T helper impliqué dans le procédé d'activation d'une telle cellule,

5 (iii) soit au moins pour une molécule inhibitrice d'au moins une protéine ou de ses fragments, ladite protéine étant choisie parmi les protéines identifiées (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24) et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de
10 l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29; les
15 protéines inhibitrices de la fonction et/ou du métabolisme et/ou de la fixation des protéines SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par
20 exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29,

(iv) soit au moins pour un ligand ou toute partie d'un ligand capable de se
25 fixer à au moins une protéine ou un fragment de protéine choisi parmi les protéines identifiées (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24) et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par
30 exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 %

d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et/ou d'inhiber sa fonction.

Plus particulièrement, par fragment d'anticorps, on entend les fragments F(ab)₂, Fab', Fab, sFv (Blazar et al., 1997, Journal of Immunology 159 : 5821-5833 ;
5 Bird et al., 1988 Science 242 : 423-426) d'un anticorps natif et par dérivé on entend, par exemple, un dérivé chimérique d'un tel anticorps (voir par exemple les chimères des anticorps antiCD3 Souris/Homme dans Arakawa et al., 1996 J Biochem 120 : 657-662 ou les immunotoxines telles que sFv-toxine de Chaudary et al 1989, Nature 339 : 394-397). Par anticorps transmembranaire on entend un anticorps dont au moins la
10 région fonctionnelle capable de reconnaître et de se fixer à son antigène spécifique est exprimée à la surface des cellules cibles pour permettre lesdites reconnaissance et fixation. Plus particulièrement, les anticorps selon la présente invention consistent en des polypeptides de fusion comprenant les amino acides définissant ladite région fonctionnelle et une séquence d'acides aminés (polypeptide transmembranaire)
15 permettant l'ancrage au sein de la double couche lipidique membranaire de la cellule cible ou à la surface externe de cette bi-couche. Les séquences nucléiques codant pour de nombreux polypeptides transmembranaires sont décrites dans la littérature. Selon un cas tout à fait avantageux, la séquence d'acide nucléique codant pour la chaîne lourde de l'anticorps est fusionnée avec la séquence d'acide nucléique codant pour un dit
20 polypeptide transmembranaire.

Par éléments assurant l'expression dudit gène *in vivo* on fait notamment référence aux éléments nécessaires pour assurer l'expression dudit gène après son transfert dans une cellule cible. Il s'agit notamment des séquences promotrices et/ou des séquences de régulation efficaces dans ladite cellule, et éventuellement les
25 séquences requises pour permettre l'expression à la surface des cellules cibles dudit polypeptide. Le promoteur utilisé peut être un promoteur viral, ubiquitaire ou spécifique de tissu ou encore un promoteur synthétique. A titre d'exemple, on mentionnera les promoteurs tels que les promoteurs des virus RSV (Rous Sarcoma Virus), MPSV, SV40 (Simian Virus), CMV (Cytomegalovirus) ou du virus de la
30 vaccine, les promoteurs du gène codant pour la créatine kinase musculaire, pour l'actine. Il est en outre possible de choisir une séquence promotrice spécifique d'un

type cellulaire donné, ou activable dans des conditions définies. La littérature procure un grand nombre d'informations relatives à de telles séquences promotrices.

Par ailleurs, ledit acide nucléique peut comprendre au moins deux séquences, identiques ou différentes, présentant une activité de promoteur transcriptionnel et/ou au moins deux gènes, identiques ou différents, situés l'un par rapport à l'autre de manière contiguë, éloignée, dans le même sens ou dans le sens inverse, pour autant que la fonction de promoteur transcriptionnel ou la transcription desdits gènes ne soit pas affectée.

De même dans ce type de construction d'acide nucléique, il est possible d'introduire des séquences nucléiques « neutres » ou introns qui ne nuisent pas à la transcription et sont épissées avant l'étape de traduction. De telles séquences et leurs utilisations sont décrites dans la littérature (référence : demande de brevet PCT WO 94/29471).

Ledit acide nucléique peut également comprendre des séquences requises pour le transport intracellulaire, pour la réplication et/ou pour l'intégration, pour la transcription et/ou la traduction. De telles séquences sont bien connues de l'homme de l'art.

Par ailleurs, les acides nucléiques utilisables selon la présente invention peuvent également être des acides nucléiques modifiés de sorte qu'il ne leur est pas possible de s'intégrer dans le génome de la cellule cible ou des acides nucléiques stabilisés à l'aide d'agents, tels que par exemple la spermine, qui en tant que tels n'ont pas d'effet sur l'efficacité de la transfection.

Selon un mode de réalisation de l'invention, la séquence d'acide nucléique est une séquence d'ADN ou ARN nue, c'est à dire libre de tout composé facilitant son introduction dans les cellules (transfert de séquence d'acide nucléique). Toutefois, selon un second mode de réalisation de l'invention, afin de favoriser son introduction dans les cellules cibles et afin d'obtenir les cellules génétiquement modifiées de l'invention, cette séquence d'acide nucléique peut être sous la forme d'un « vecteur », et plus particulièrement sous la forme d'un vecteur viral, tel que par exemple un vecteur adénoviral, rétroviral, un vecteur dérivé d'un poxvirus, notamment dérivé du virus de la vaccine ou du Modified Virus Ankara (MVA) ou d'un vecteur non viral tel que, par exemple, un vecteur consistant en au moins une dite séquence d'acide

nucléique complexée ou conjuguée à au moins une molécule ou substance porteuse sélectionnée parmi le groupe consistant en un amphiphile cationique, notamment un lipide cationique, un polymère cationique ou neutre, un composé polaire pratique notamment choisi parmi le propylène glycol, le polyéthylène glycol, le glycérol, l'éthanol, la 1-méthyl L-2-pyrrolidone ou leurs dérivés, et un composé polaire aprotique notamment choisi parmi le diméthylsulfoxyde (DMSO), le diéthylsulfoxyde, le di-n-propylsulfoxyde, le diméthylsulfone, le sulfolane, la diméthylformamide, le diméthylacetamide, la tetraméthylurée, l'acétonitrile ou leurs dérivés. La littérature procure un nombre important d'exemples de tels vecteurs viraux et non viraux.

De tels vecteurs peuvent en outre et de préférence comprendre des éléments de ciblage pouvant permettre de diriger le transfert de séquence d'acide nucléique vers certains types cellulaires ou certains tissus particuliers tels que les cellules cytotoxiques et les cellules présentatrices de l'antigène). Ils peuvent également permettre de diriger le transfert d'une substance active vers certains compartiments intracellulaires préférés tel que le noyau, les mitochondries ou les peroxysomes, par exemple. Il peut en outre s'agir d'éléments facilitant la pénétration à l'intérieur de la cellule ou la lyse de compartiments intracellulaires. De tels éléments de ciblage sont largement décrits dans la littérature. Il peut par exemple s'agir de tout ou partie de lectines, de peptides, notamment le peptide JTS-1 (voir demande de brevet PCT WO 94/40958), d'oligonucléotides, de lipides, d'hormones, de vitamines, d'antigènes, d'anticorps, de ligands spécifiques de récepteurs membranaires, de ligands susceptibles de réagir avec un anti-ligand, de peptides fusogènes, de peptides de localisation nucléaire, ou d'une composition de tels composés.

Utilisation de cellules transformées *in vivo* après injection de vecteurs contenant au moins un gène d'intérêt thérapeutique défini à partir des protéines d'intérêt identifiées dans la présente invention (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24) et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 %

d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29.

La présente invention concerne un matériel biologique pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinée à la prévention et au traitement de mammifères atteint de maladies dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, de préférence la sclérose en plaques, la composition comprenant au moins un vecteur contenant un gène thérapeutique comme décrit ci-dessous, capable d'être introduit dans une cellule cible *in vivo* et d'exprimer le gène d'intérêt thérapeutique *in vivo*. L'avantage de cette invention repose sur la possibilité de maintenir sur le long terme un niveau basal de molécules exprimées dans le patient traité. Des vecteurs ou acides nucléiques codant pour des gènes d'intérêt thérapeutique sont injectés. Ces vecteurs et acides nucléiques doivent être transportés jusqu'aux cellules cibles et transfecter ces cellules dans lesquelles ils doivent être exprimés *in vivo*.

L'invention concerne l'expression *in vivo* de séquences nucléotidiques et/ou de vecteurs tels que désignés dans le paragraphe précédent, c'est-à-dire des séquences correspondant à des gènes d'intérêt thérapeutique codant notamment :

(i) soit au moins pour une protéine choisie parmi les protéines identifiées dans la présente invention (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24) et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, ou leur(s) fragment(s),

(i) soit au moins pour tout ou partie d'un anticorps polyclonal ou monoclonal capable de se fixer à au moins une protéine choisie parmi les protéines identifiées dans la présente invention (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24) et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la

calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une
5 quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29. Il peut s'agir d'anticorps transmembranaire natif, ou de fragment ou dérivé d'un tel anticorps, pour autant que ledit anticorps, fragment ou dérivé d'anticorps soit exprimé à la surface de la cellule cible de mammifère génétiquement modifiée et en ce que ledit anticorps est capable de se fixer à un polypeptide présent à la surface d'une cellule effectrice cytotoxique
10 ou d'un lymphocyte T helper et impliqué dans le procédé d'activation d'une telle cellule. Il peut s'agir de fragments d'anticorps exprimés par des cellules capables de sécréter lesdits anticorps dans la circulation sanguine d'un mammifère ou patient porteur des cellules génétiquement modifiées par le gène codant pour l'anticorps,

(ii) soit au moins pour une molécule inhibitrice d'au moins une
15 protéine choisie parmi les protéines identifiées (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24) et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatiche de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3,
20 SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29; protéine inhibitrice de la fonction et/ou du métabolisme et/ou de la fixation des protéines SEQ ID N° 2, 4,
25 8,9, 17, 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatiche de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID
30 N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement

au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29,

(iii) soit au moins pour un ligand ou toute partie du ligand capable de se fixer sur au moins une protéine choisie parmi les protéines identifiées (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24) et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmaticque de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et/ou d'inhiber sa fonction.

Selon un mode de réalisation particulier, il s'agit d'utiliser la thérapie génique de manière à diriger la réponse immune contre la protéine, le peptide ou la molécule d'intérêt cible, c'est-à-dire contre toute protéine choisie parmi les protéines SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmaticque de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, leur(s) fragment(s) et/ou contre toute molécule inhibitrice de la fonction et/ou de l'expression et/ou du métabolisme desdites protéines d'intérêt, et/ou des ligands desdites protéines comme par exemple les récepteurs. Pour cela il est évident que les cellules à cibler pour la transformation avec un vecteur sont des cellules appartenant au système immunitaire, soit des cellules de type lymphocytes (CD4/CD8), soit des cellules présentatrices de l'antigène (cellules dendritiques, macrophages, ...).

Selon un mode de réalisation particulier, on modifie génétiquement, notamment *in vivo*, les cellules présentatrices de l'antigène (CPA). Les CPA comme les

macrophages, les cellules dendritiques, les microgliocytes, les astrocytes jouent un rôle dans l'initiation de la réponse immunitaire. Elles sont les premiers composants cellulaires qui capturent l'antigène, l'apprête dans la cellule et expriment des molécules du CMHI et CMHII transmembranaires impliquées dans la présentation de l'immunogène aux cellules T CD4+ et CD8+, elles produisent des protéines accessoires spécifiques qui participent à l'activation des cellules T (Debrick et al., 1991, J. Immunol 147 : 2846 ; Reis et al., 1993, J Ep Med 178 : 509 ; Kovacsovics-bankowski et al., 1993, PNAS 90 : 4942; Kovacsovics-bankowski et al., 1995 Science 267 : 243 ; Svensson et al., 1997, J Immunol 158 : 4229 ; Norbury et al., 1997, Eur J Immunol 27 : 280). Pour une vaccination, il peut être avantageux de disposer d'un système de thérapie génique qui peut cibler le transfert de gène dans de telles cellules APC, c'est-à-dire un gène qui code pour un polypeptide qui peut, après sa production intracellulaire et son « processing », être présenté aux cellules CD8+ et/ou CD4+ par les molécules des complexes CMHI et CMHII respectivement à la surface de ces cellules.

On choisit d'exprimer à la surface des cellules CPA *in vivo* tout ou partie d'un anticorps et/ou d'un ligand comme par exemple un récepteur, capable de réagir avec la protéine ou le peptide cible choisis parmi les protéines SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29. De telles cellules vont alors spécifiquement phagocyter ladite protéine ou ledit peptide, le « processer » de façon à ce que des fragments de ce peptide soient présentés à la surface des cellules présentatrices de l'antigène.

La littérature propose un grand nombre d'exemples de gènes codant pour des anticorps capables de réagir avec des polypeptides ou récepteurs. Il est à la portée de l'homme de l'art d'obtenir les séquences d'acides nucléiques codant pour de tels anticorps. Citons par exemple les gènes codant pour les chaînes légère et lourde de

l'anticorps YTH 12.5 (anti-CD3) (Routledge et al. 1991, Eur J Immunol 21 : 2717-2725), de l'anti-CD3 selon Arakawa et al ; 1996, J. Biochem. 120 : 657-662. Les séquences d'acide nucléique de tels anticorps sont aisément identifiables à partir des bases de données communément utilisées par l'homme du métier. Il est également possible à partir d'hybridomes disponibles auprès de l'ATCC de cloner les séquences d'acides nucléiques codant pour les chaînes lourdes et/ou légères de ces différents anticorps par les méthodes d'amplification telles que la RT-PCR à l'aide d'oligonucléotides spécifiques ou les techniques mettant en œuvre des banques d'ADNc (Maniatis et al., 1982, Molecular cloning. A laboratory manual CSH Laboratory, Cold Spring Harbor, New York). Les séquences ainsi clonées sont alors disponibles pour leur clonage dans des vecteurs. Selon un cas préféré de l'invention, la séquence d'acide nucléique codant pour la chaîne lourde de l'anticorps est fusionnée par recombinaison homologue avec la séquence d'acide nucléique codant pour un polypeptide transmembranaire tel que la glycoprotéine rabique ou la gp160 (Polydefkis et al., 1990, J Exp Med 171 : 875-887). Ces techniques de biologie moléculaire ont été parfaitement bien décrites.

On choisit d'exprimer à la surface des cellules CPA *in vivo* des fragments immunogènes correspondant à au moins une protéines choisie parmi les protéines SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmétique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29. Pour cela, on peut choisir de faire exprimer par le vecteur soit le polypeptide complet soit de manière préférée des polypeptides sélectionnés pour réagir avec des ligands et/ou récepteurs spécifiques. Le peptide immunogène codé par le polynucléotide introduit dans la cellule du vertébré *in vivo* peut être produit et/ou sécrété, apprêté puis présenté à une cellule présentatrice de l'antigène (APC) dans le contexte des molécules du CMH. Les APC ainsi transférées *in vivo* induisent une réponse immune dirigée contre

l'immunogène exprimé *in vivo*. Les APC possèdent différents mécanismes pour capturer les antigènes : (a) la capture des antigènes par des récepteurs membranaires comme les récepteurs aux immunoglobulines (Fc) ou pour le complément disponibles à la surface des granulocytes, des monocytes ou macrophages permettant une délivrance efficace de l'antigène dans les compartiments intracellulaires après phagocytose médiée par les récepteurs. (b) l'entrée dans les APC par pinocytose en phase fluide, impliquant différents mécanismes : la micropinocytose c'est-à-dire la capture de petites vésicules (0.1 µm) par les puits recouverts de clathrine et la macropinocytose c'est-à-dire la capture de plus grosses vésicules (avec une taille variant entre 0.5 µm et environ 6 µm) (Sallusto et al. 1995, J Exp Med 182 : 389-400). Tandis que la micropinocytose existe de façon constitutive dans toutes les cellules, la macropinocytose est limitée à des types cellulaires, comme par exemple les macrophages, les cellules dendritiques, les astrocytes, les cellules épithéliales stimulées par des facteurs de croissance (Racoosin et al., J Cell Sci 1992, 102 : 867-880). Dans cette invention, on entend par cellules capables de macropinocytose, les cellules qui peuvent réaliser les événements décrits ci-dessus et les cellules qui peuvent capturer des macromolécules de préférence entre 0.5 µm et environ 6 µm dans le cytoplasme.

Selon un mode de réalisation particulier, on modifie génétiquement notamment *in vivo*, les cellules effectrices cytotoxiques ou les lymphocytes T helper de façon à ce qu'elles expriment à leur surface un polypeptide correspondant aux protéines SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, à des ligands desdites protéines, naturellement non exprimés par ces cellules, et capables d'induire le procédé d'activation de telles cellules, par l'introduction dans ces cellules de séquences d'acide nucléique renfermant le gène codant pour un tel polypeptide. Conformément à la présente invention, il est également possible de sélectionner une

séquence d'acide nucléique contenant un gène d'intérêt thérapeutique codant pour tout ou partie d'un anticorps dirigé contre une protéine choisie parmi les protéines SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, susceptible d'être exprimé à la surface des cellules cibles du patient à traiter, ledit anticorps étant capable de se fixer à un polypeptide naturellement non exprimé par ces cellules effectrices cytotoxiques ou lymphocytes T helper.

Par cellules effectrices cytotoxiques, on entend désigner les macrophages, les astrocytes, les lymphocytes T cytotoxiques (TCL) et les cellules tueuses (NK) ainsi que leurs dérivés telles que par exemple les LAK (Versteeg 1992 Immunology today 13 : 244-247 ;Brittende et al 1996, Cancer 77 :1226-1243). Par 'lymphocytes T helper' on entend désigner notamment les CD4 qui permettent après activation la sécrétion de facteurs d'activation des cellules effectrices de la réponse immune. Les polypeptides et notamment les récepteurs exprimés à la surface de ces cellules et qui sont impliqués dans l'activation de telles cellules consistent notamment en tout ou partie du complexe TCR ou le CD3, tout ou partie des complexes CD8, CD4, CD28, LFA-1, 4-1BB (Melero et al., 1998, Eur J Immunol 28 : 1116-1121), CD47, CD2, CD1, CD9, CD45, CD30, CD40, tout ou partie des récepteurs de cytokines (Finke et al., 1998, Gene therapy 5 : 31-39), telles que IL-7, IL-4, IL-2, IL-15 ou GM-CSF, tout ou partie du complexe récepteur des cellules NK tel que par exemple NKAR, Nkp46, .. ; (Kawano et al., 1998 Immunology 95 :5690-5693 ; Pessino et al., 1998 J Exp Med188 :953-960), Nkp44, tout ou partie des récepteurs de macrophages tels que par exemple le récepteur Fc (Deo et al., 1997, Immunology Today 18 : 127-135).

De nombreux outils ont été développés pour introduire différents gènes hétérologues et/ou vecteurs dans des cellules, en particulier des cellules de mammifères. Ces techniques peuvent être divisées en deux catégories : la première

catégorie implique des technique physiques comme la micro-injection, l'électroporation ou le bombardement de particules. La seconde catégorie est basée sur l'utilisation de techniques en biologie moléculaire et cellulaire avec lesquelles le gène est transféré avec un vecteur biologique ou synthétique qui facilite l'introduction du matériel dans la cellule *in vivo*. Aujourd'hui, les vecteurs les plus efficaces sont les vecteurs viraux en particulier les adénoviraux et rétroviraux. Ces virus possèdent des propriétés naturelles pour traverser les membranes plasmiques, éviter la dégradation de leur matériel génétique et introduire leur génome dans le noyau de la cellule. Ces virus ont été largement étudiés et certains sont déjà utilisés expérimentalement dans des applications humaines en vaccination, en immunothérapie, ou pour compenser des déficiences génétiques. Cependant cette approche virale a des limitations notamment due à la capacité de clonage restreinte dans ces génomes viraux, le risque de disséminer les particules virales produites dans l'organisme et l'environnement, le risque de mutagenèse artéfactuelle par insertion dans la cellule hôte dans le cas des rétrovirus, et la possibilité d'induire une forte réponse immune inflammatoire *in vivo* pendant le traitement, ce qui limite le nombre d'injections possibles (Mc Coy et al. 11995, Human Gene Therapy 6 : 1553-1560 ; Yang et al., 1996 Immunity 1 : 433-422). D'autres systèmes alternatifs à ces vecteurs viraux existent. L'utilisation de méthodes non virales comme par exemple la co-précipitation avec le phosphate de calcium, l'utilisation de récepteurs qui miment les systèmes viraux (pour un résumé voir Cotten et Wagner 1993, Current Opinion in Biotechnology, 4 : 705-710), ou l'utilisation de polymères comme les polyamidoamines (Haensler et Szoka 1993, Bioconjugate Chem 4 : 372-379). D'autres techniques non virales sont basées sur l'utilisation de liposomes dont l'efficacité pour l'introduction de macromolécules biologiques comme l'ADN, l'ARN des protéines ou des substances pharmaceutiques actives a été largement décrite dans la littérature scientifique. Dans ce domaine des équipes ont proposé l'utilisation de lipides cationiques ayant une forte affinité pour les membranes cellulaires et/ou les acides nucléiques. En fait, il a été montré qu'une molécule d'acide nucléique elle-même pouvait traverser la membrane plasmique de certaines cellules *in vivo* (WO 90/11092), l'efficacité étant dépendante en particulier de la nature polyanionique de l'acide nucléique. Dès 1989 (Felgner et al., Nature 337 : 387-388) les lipides cationiques ont été proposés pour faciliter l'introduction de larges molécules

anioniques, ce qui neutralise les charges négatives de ces molécules et favorise leur introduction dans les cellules. Différentes équipes ont développés de tels lipides cationiques : le DOTMA (Felgner et al., 1987, PNAS 84 : 7413-7417), le DOGS ou TransfectamTM (Behr et al., 1989, PNAS 86 : 6982-6986), le DMRIE et le DORIE (Felgner et al., 1993 methods 5 : 67-75), le DC-CHOL (Gao et Huang 1991, BBRC 179 : 280-285), le DOTAPTM (McLachlan et al., 1995, Gene therapy 2 : 674-622) ou la LipofectamineTM, et les autres molécules décrites dans les brevets WO9116024, WO9514651, WO9405624. D'autres groupes ont développés des polymères cationiques qui facilitent le transfert de macromolécules en particulier des macromolécules anioniques dans les cellules. Le brevet WO95/24221 décrit l'utilisation de polymères dendritiques, le document WO96/02655 décrit l'utilisation du polyéthylèneimine ou polypropylèneimine et les document US-A-5595897 et FR 2719316, l'utilisation des conjugués polylysine.

Etant donné que l'on souhaite obtenir *in vivo* une transformation ciblée vers un type cellulaire donné, il est évident que le vecteur utilisé doit pouvoir être lui-même « ciblé », comme décrit ci dessus.

Utilisation de cellules transformées *in vitro* ou *ex vivo* avec des vecteurs contenant un gène d'intérêt thérapeutique défini par rapport aux protéines d'intérêt identifiées dans la présente invention (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24) et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29.

La présente invention concerne un matériel biologique pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinée à la prévention et au traitement de maladies dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, de préférence la sclérose en plaques, la composition comprenant au moins une cellule, notamment une cellule ne produisant pas naturellement des anticorps, sous une forme permettant leur

administration dans l'organisme d'un mammifère, humain ou animal, ainsi qu'éventuellement leur culture préalable, ladite cellule étant génétiquement modifiée *in vitro* par au moins une séquence d'acide nucléique contenant au moins un gène codant *in vivo* pour :

5 (i) au moins une protéine choisie parmi les protéines SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmaticque de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par
10 exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID
15 N° 1 à 29 et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et tout fragment

(ii) au moins un peptide défini à partir de la séquence primaire d'au moins une protéine choisie parmi les protéines SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24, et les
20 séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmaticque de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et
25 les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29,

(iii) au moins toute molécule inhibitrice de la fonction et/ou de la fixation et/ou de l'expression de ces protéines,

30 (iv) au moins un peptide issu de la séquence primaire d'une protéine choisie parmi les protéines SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de

protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et capable de se fixer sur au moins une glycoprotéine du CMHI,

(v) au moins tout anticorps et toute partie d'anticorps capables de se fixer à au moins une protéine choisie parmi les protéines SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29.

Plus particulièrement, ladite cellule cible provient soit du mammifère à traiter, soit d'un autre mammifère que celui à traiter. Dans ce dernier cas, il convient de noter que ladite cellule cible aura subi un traitement la rendant compatible avec le mammifère à traiter. Par « mammifère » on entend, de préférence, un mammifère humain. Ces cellules sont établies en lignées cellulaires et sont préférentiellement CMHII⁺ ou CMHII⁺-inductibles comme les lymphocytes, les monocytes, les astrocytes, les oligodendrocytes.

L'invention concerne également les cellules modifiées et un procédé de préparation d'une cellule telle que décrite ci dessus caractérisé en ce que l'on introduit dans une cellule de mammifère ne produisant pas naturellement d'anticorps, par tout moyen approprié, au moins une séquence d'acide nucléique contenant au moins un gène d'intérêt thérapeutique et des éléments assurant l'expression dudit gène dans ladite cellule, ledit gène d'intérêt thérapeutique contenant une séquence d'acide nucléique codant pour une molécule ou un fragment de molécule *in vivo*, comme décrit

juste ci-dessus. Plus particulièrement, elle concerne des cellules procaryotes, des cellules de levure et des cellules animales, en particulier des cellules de mammifères transformées par au moins une séquence nucléotidique et/ou un vecteur tel que décrit précédemment.

5 Selon un mode de réalisation particulier, les cellules (cellules dendritiques, macrophages, astrocytes, lymphocytes T CD4+, lymphocytes T CD8+,) du patient ou allogéniques sont placées en contact d'une préparation purifiée du polypeptide cible, celui-ci étant internalisé, apprêté et présenté à la surface cellulaire associée aux molécules du CMHI et/ou CMHII et ainsi induire une réponse immunitaire
10 spécifique contre le peptide. Les cellules « activées » sont ensuite administrées au patient chez lequel elles vont induire une réponse immunitaire spécifique des antigènes (on utilise une voie naturelle de la réponse immunitaire, mais on contrôle ce que la cellule présentatrice de l'antigène va présenter)

 Selon un mode de réalisation particulier, les cellules présentatrices
15 d'antigène (cellule dendritique, macrophage, astrocytes,...) sont modifiées *in vitro* pour exprimer les antigènes dans la cellule transformée qui vont s'associer aux molécules du CMHI et/ou CMHII et être présentées à la surface des cellules pour induire chez le patient chez lequel on administre la cellule modifiée une réaction immunitaire parfaitement ciblée.

20 Toutes les approches vaccinales ne sont pas toujours satisfaisantes et conduisent par exemple à des réactions immunitaires limitées dirigées uniquement à l'encontre d'épitopes immunodominants ou contre des antigènes présentant une grande variabilité. De même la présentation incorrecte des antigènes par les glycoprotéines du système CMH à la surface des cellules, ne permet pas de développer chez le patient
25 traité une immunité anti-protéine d'intérêt convenable. Afin de pallier ces problèmes, certains auteurs ont proposé dans le cadre de tels procédés vaccinaux, de sélectionner les fragments minimaux antigéniques correspondant aux portions de peptide susceptibles d'être reconnus spécifiquement par les lymphocytes T cytotoxiques, de les exprimer dans les cellules afin qu'ils s'associent aux molécules du CMHI et soient
30 présentés à la surface des cellules pour induire chez le patient traité une réaction immunitaire parfaitement ciblée (Toes et al. 1997, PNAS 94 : 14660-14665). Plus particulièrement, il a été montré que des épitopes de très petites tailles (variant de 7 à

environ 13 acides aminés) qui sont exprimés à partir de minigènes introduits dans un virus de la vaccine, pouvaient induire une immunisation de type cellulaire. Il a par ailleurs été montré que plusieurs minigènes pouvaient être exprimés conjointement à partir d'un même vecteur (cette construction particulière est appelée « string of beads »). Une telle construction présente l'avantage d'induire une réaction immune de type CTL synergique (Whitton et al., 1993 J. of Virology 67 : 348-352).

Protocole de mise en contact des cellules et du fragment antigénique :

La présentation des fragments antigéniques par les molécules CMHI repose sur un procédé intracellulaire identifié (voir Groettrup et al., 1996 Immunology Today 17 : 429-435 pour une revue) au cours duquel des peptides antigéniques de très courtes tailles (environ 7-13 acides aminés) sont produits par dégradation d'un polypeptide plus complexe contre lequel la réaction immune finale sera dirigée. Ces courts peptides sont ensuite associés aux molécules du CMHI ou du CMHII pour former un complexe protéique qui est transporté à la surface cellulaire afin de présenter lesdits peptides aux lymphocytes T cytotoxiques circulants ou aux lymphocytes T helper circulants, respectivement. Il convient en outre de noter que la spécificité des molécules CMH I ou CMH II vis-à-vis des peptides antigéniques varie en fonction des molécules CMH I ou CMH II (exemple pour le CMHI : HLA-A, HLA-B, ...) et de l'allèle (exemple pour le CMH I : HLA-A2, HLA-A3, HLA-A11) considérés. Au sein d'une même espèce animale, d'un individu à l'autre, il existe une grande variabilité des gènes codant pour les molécules du système CMH (à ce sujet, voir notamment George et al., 1995, Immunology Today 16 : 209-212).

Selon un mode de réalisation particulier, les cellules, telles que les cellules dendritiques, les macrophages, les astrocytes, les lymphocytes T CD4+, les lymphocytes T CD8+, sont modifiées de manière à exprimer à leur surface des anticorps spécifiques du peptide ciblé. Le peptide est neutralisé par les anticorps exprimés à la surface des cellules. Ces cellules sont de préférence immunes, de préférence du patient, de préférence cytotoxiques, modifiées pour exprimer tout ou partie d'un anticorps spécifique du polypeptide cible.

Isolement de cellules mononucléées à partir de sang périphérique :

En 1968, Boyum décrit une technique rapide qui permet par centrifugation du sang sur gradient de densité, de séparer les cellules mononucléées

(lymphocytes et monocytes) avec un bon rendement (rendement théorique 50 %, c'est-à-dire 10^6 cellules /ml de sang). 50 ml de sang périphérique prélevés stérilement dans des tubes héparinés sont centrifugés 20 minutes à 150g à 20°C. Les cellules récupérées sont diluées dans deux volumes de sang périphérique initial de PBS stérile. 10 ml de
5 cette suspension sont déposés sur 3ml d'une solution de Ficoll-Hypaque (milieu de séparation des lymphocytes, Flow). Après centrifugation pendant 20 minutes à 400g et 20°C sans freinage de décélération, les cellules mononucléées sédimentent à l'interface PBS-Ficoll, en une couche dense, opalescente, alors que la quasi-totalité des globules rouges et des polynucléaires sédimentent au fond du tube. Les cellules
10 mononucléées sont récupérées et lavées en PBS stérile.

Internalisation des antigènes par les cellules présentatrices de l'antigène :

Traitement préalable des cellules présentatrices de l'antigène : les cellules présentatrices de l'antigène sont préalablement lavées avec un tampon PBS-BSA à 0.5% (p/v) puis énumérées puis elle sont préincubées en présence de différents
15 inhibiteurs de réduction trois fois en PBS-BSA 0.5% contenant de 10 μ M à 10 mM final de DTNB (acide 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque) ou de NEM (N-éthylmaléimide). Les étapes ultérieures de fixation d'antigènes à la surface cellulaire ou d'internalisation d'antigènes se réalisent aussi en présence des différentes concentrations d'inhibiteurs.

20 Protocole d'internalisation des antigènes par les cellules présentatrices de l'antigène :

8.10^6 cellules sont internalisées en présence de quantité saturante de protéines radiomarquées à l'iode 125 (1 μ g) dans des micropuits dans 70 μ l. Après une heure d'incubation à 4°C sous agitation, les antigènes sont fixés à la surface des
25 cellules. La suspension cellulaire est lavée deux fois en PBS-BSA et les culots cellulaires sont repris dans 70 μ l de tampon et incubées à 37°C pendant différentes périodes allant jusqu'à 2 heures. Cellules et surnageants sont séparés par centrifugation à 800g pendant 5 minutes 4°C. Pour des plus longues périodes d'incubation, l'étape préliminaire de préfixation des antigènes à la surface des cellules est supprimée. Les
30 cellules sont diluées dans un milieu RPMI-10% SVF en présence de 20 mM Hépès, à 10^6 cellules /ml. Les cellules sont incubées en présence d'un excès d'antigène pendant

différentes périodes à 37°C (1 µg de molécules /5.10⁷ cellules monocytes/macrophages ou /10⁸ cellules B-EBV).

Tous les agents thérapeutiques définis dans le cadre de la présente invention sont utilisés pour prévenir et/ou traiter une maladie dégénérative et/ou
5 neurologique et/ou auto-immune, telle que la sclérose en plaques, seuls ou en combinaison. Ils peuvent être utilisés également pour évaluer leur efficacité *in vitro* ou *in vivo*.

Administration chez l'homme des agents thérapeutiques:

Le matériel biologique selon l'invention peut être administré *in vivo*
10 notamment sous forme injectable. On peut également envisager une injection par voie épidermique, intraveineuse, intra-artérielle, intramusculaire, intracérébrale par seringue ou tout autre moyen équivalent. Selon un autre mode de réalisation par administration orale ou tout autre moyen parfaitement connu de l'homme de l'art et applicable à la présente invention. L'administration peut avoir lieu en dose unique ou répétée, une ou
15 plusieurs fois après un certain délai d'intervalle. La voie d'administration et le dosage les mieux appropriés varient en fonction de différents paramètres tels que par exemple l'individu ou la maladie à traiter, du stade et/ou de l'évolution de la maladie, ou encore de l'acide nucléique et/ou de la protéine et/ou peptide et/ou molécule et/ou cellule à transférer ou de l'organe/tissus cible.

20 Pour la mise en œuvre du traitement du mammifère mentionné dans la présente invention, il est possible de disposer de compositions pharmaceutiques comprenant un matériel biologique tel que précédemment décrit, avantageusement associé avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour l'administration à l'homme ou à l'animal. L'utilisation de tels supports est décrite dans la littérature (voir
25 par exemple Remington's Pharmaceutical Sciences 16th ed. 1980, Mack Publishing Co). Ce véhicule pharmaceutiquement acceptable est préférentiellement isotonique, hypotonique ou présente une faible hypertonicité et a une force ionique relativement basse, tel que par exemple une solution de sucrose. Par ailleurs, ladite composition peut contenir des solvants, des véhicules aqueux ou partiellement aqueux tels que de l'eau
30 stérile, libre d'agents pyrogène et des milieux de dispersion par exemple. Le pH de ces compositions pharmaceutiques est convenablement ajusté et tamponné selon les techniques conventionnelles.

Figures :

La figure 1 représente la séquence en amino acides de la protéine GM2AP, et la localisation des peptides, qui est soulignée, et qui sont utilisés pour la production des anticorps anti-peptides GM2AP.

La figure 2 représente la séquence en amino acides de la protéine MRP14, et la localisation des peptides, qui est soulignée, et qui sont utilisés pour la production des anticorps anti-peptides MRP14.

La figure 3 représente la séquence en amino acides de la protéine Saposine B, et la localisation des peptides, qui est soulignée, et qui sont utilisés pour la production des anticorps anti-peptides Saposine B.

La figure 4 représente le dosage de la protéine MRP8 (ng/ml - en ordonnée) dans les urines de patients atteints de sclérose en plaques (SEP), dans les urines de patients atteints d'autres maladies neurologiques (AMN) et dans les urines de témoins considérés sains (TS). n signifie le nombre d'urines testées par catégorie.

La figure 5 représente le dosage de la protéine MRP14 (ng/ml - en ordonnée) dans les urines de patients atteints de sclérose en plaques (SEP), dans les urines de patients atteints d'autres maladies neurologiques (AMN) et dans les urines de témoins considérés sains (TS). n signifie le nombre d'urines testées par catégorie.

La figure 6 représente le dosage de la protéine MRP8/14 (ng/ml - en ordonnée) dans les urines de patients atteints de sclérose en plaques (SEP), dans les urines de patients atteints d'autres maladies neurologiques (AMN) et dans les urines de témoins considérés sains (TS). n signifie le nombre d'urines testées par catégorie.

La figure 7 représente les concentrations moyennes des protéines MRP8, MRP14, MRP8/14 (ng/ml - en ordonnée) dans les urines de patients atteints de sclérose en plaques (SEP), dans les urines de patients atteints d'autres maladies neurologiques (AMN) et dans les urines de témoins considérés sains (TS). n signifie le nombre d'urines testées par catégorie.

La figure 8 représente le dosage de la protéine GM2AP (ng/ml - en ordonnée) dans les urines de patients atteints de sclérose en plaques (SEP), dans les urines de patients atteints d'autres maladies neurologiques (AMN) et dans les urines de témoins considérés sains (TS). n signifie le nombre d'urines testées par catégorie. MS

signifie SEP, OND signifie AMN et Healthy signifie prélèvements de témoins supposés sains (TS).

La figure 9 représente le dosage de la protéine Saposine B ($\mu\text{g/ml}$ - en ordonnée) dans les urines de patients atteints de sclérose en plaques (SEP), dans les urines de patients atteints d'autres maladies neurologiques (AMN) et dans les urines de témoins considérés sains (TS). n signifie le nombre d'urines testées par catégorie. MS signifie SEP, OND signifie AMN et Healthy signifie prélèvements de témoins supposés sains (TS).

La figure 10 représente la co-détection des protéines Saposine B ($\mu\text{g/ml}$ - en ordonnée) et GM2AP (ng/ml - en abscisse) dans des échantillons d'urine de patients SEP, de témoins supposés sains et de patients atteints d'autres maladies neurologiques et la corrélation observée entre les taux des deux protéines.

La figure 11 représente : figure 11A, le dosage de la protéine GM2AP en ng/ml dans les urines d'un patient SEP en forme rémittente progressive (courbe claire) et la gliotoxicité en pourcentage de cellules mortes estimées par le test MTT (courbe foncée) ; figure 11B le dosage de la protéine Saposine B en $\mu\text{g/ml}$ dans les urines d'un patient SEP en forme rémittente progressive (courbe claire) et la gliotoxicité en pourcentage de cellules mortes estimées par le test MTT (courbe foncée).

La figure 12 représente le produit des concentrations des protéines GM2AP et saposine B en $\text{ng}\times\mu\text{g/ml}^2$ dans les urines d'un patient SEP en forme rémittente progressive (courbe claire) et la gliotoxicité en pourcentage de cellules mortes estimées par le test MTT (courbe foncée).

La figure 13 : figure 13A, le dosage de la protéine GM2AP en ng/ml dans les urines d'un patient SEP en forme progressive (courbe claire) et la gliotoxicité en pourcentage de cellules mortes estimées par le test MTT (courbe foncée) ; figure 13B le dosage de la protéine Saposine B en $\mu\text{g/ml}$ dans les urines d'un patient SEP en forme progressive (courbe claire) et la gliotoxicité en pourcentage de cellules mortes estimées par le test MTT (courbe foncée).

La figure 14 représente le produit des concentrations des protéines GM2AP et saposine B en $\text{ng}\times\mu\text{g/ml}^2$ dans les urines d'un patient SEP en forme progressive (courbe claire) et la gliotoxicité en pourcentage de cellules mortes estimées par le test MTT (courbe foncée).

La figure 15 représente la corrélation entre les concentrations de GM2AP en ng/ml (abscisse) et de gliotoxicité en pourcentage de cellules mortes estimées par le test MTT (ordonnée) déterminées dans des urines de patients SEP et de témoins.

La figure 16 représente la corrélation entre les concentrations de Saposine B en $\mu\text{g/ml}$ (abscisse) et de gliotoxicité en pourcentage de cellules mortes estimées par le test MTT (ordonnée) déterminées dans des urines de patients SEP et de témoins.

La figure 17 représente la corrélation entre le produit des concentrations de GM2AP et Saposine B en $\text{ng}\times\mu\text{g/ml}^2$ (abscisse) et de gliotoxicité en pourcentage de cellules mortes estimées par le test MTT (ordonnée) déterminées dans des urines de patients SEP et de témoins.

La figure 18 représente la corrélation entre les concentrations en GM2AP (ng/ml - en ordonnée gauche), les concentrations en Saposine B ($\mu\text{g/ml}$ - ordonnée droite) et la gliotoxicité en pourcentage de cellules mortes estimées par le test MTT (abscisse). Deux droites de corrélation estimées sont représentées sur le graphe. Les lignes en gras sont relatives aux concentrations en saposine B ; les lignes en noir clair sont relatives aux concentrations en GM2AP.

Exemples :

Exemple 1 : Recueil et pool d'urines.

Des échantillons d'urine de volumes différents ont été prélevés à partir d'individus sains (SEP négatifs) n'ayant a priori aucune maladie neurologique ou auto-immune. L'activité toxique de chaque prélèvement vis à vis de cellules astrocytaires murines a été testée *in vitro* en utilisant le test MTT. Au total un pool de 20 litres d'urine a été constitué (pool SEP négatif). Parallèlement, des échantillons d'urine de volumes différents ont été prélevés à partir d'individus atteints de sclérose en plaques (SEP positifs) à différents stade de la maladie. L'activité toxique de chaque prélèvement vis à vis de cellules astrocytaires murines a été testée *in vitro* en utilisant le test MTT. Au total un pool de 80 litres d'urine a été constitué (pool SEP positif).

Exemple 2 : Purification des protéines urinaires.

Les pools d'urine SEP positif et SEP négatif, recueillis et testés selon l'exemple 1, ont été purifiés pour obtenir une concentration en protéines élevée et éliminer au maximum les protéines de haut poids moléculaire.

Précipitation : des précipitations au sulfate d'ammonium (Prolabo - réf. 21 333 365) ont été effectuées sur les pools d'urine SEP positif et SEP négatif. Le pourcentage de 60 % de sulfate d'ammonium saturé pour 40 % d'urine, soit 390 grammes de sulfate d'ammonium par litre d'urine a été utilisé. Chaque pool est réparti en fractions de 1,8 litres dans des flacons de 2 litres pour améliorer la précipitation. La précipitation a été effectuée durant 2 x 8 heures, à température ambiante, sous agitation douce. Après centrifugation des pools d'urine à 3 000 tpm pendant 10 min., à une température de 10°C, le culot obtenu est repris dans un tampon Tris 20 mM contenant du CaCl_2 1 mM et de l'urée à 0,25 M. Le mélange a ensuite été centrifugé à 3 000 tpm pendant 10 min. Le surnageant contient les protéines concentrées. Il est soit utilisé immédiatement pour l'étape suivante, soit congelé si l'étape suivante ne peut être effectuée en continu.

Chromatographie par échange d'ions : la solution contenant les protéines a ensuite été passée sur un gel DEAE fast Flow (commercialisé par PHARMACIA). Cette étape est effectuée à basse pression sur une colonne PHARMACIA remplie de gel. Les tampons sont amenés sur la colonne par une pompe péristaltique qui permet un débit régulier. Le tampon d'équilibration de la colonne est le tampon Tris 20 mM, pH 7. La fraction correspondant au surnageant de précipitation et contenant une quantité de sels trop élevée est dialysée contre ce tampon avant dépôt sur la colonne. Une élution par un gradient salin permet de récupérer les protéines. Le gradient d'élution est effectué par palier de NaCl 100, 200, 300, 500 mM dans le tampon d'équilibration de la colonne. Les fractions d'élution sont testées par le test MTT et ne seront conservées que les fractions positives, soit la fraction éluee à 200 mM NaCl. Ces fractions pourront être traitées immédiatement ou conservées à l'état lyophilisé.

Purification : Une chromatographie d'exclusion stérique basée sur la différence de taille et de forme des protéines à éluer a été utilisée. La fraction correspondant à l'élution 200 mM NaCl est déposée sur la colonne. Au cours de l'élution, les protéines de faible masse moléculaire sont retenues et donc éluées plus tardivement que les grosses molécules. Les purifications ont été effectuées sur HPLC

avec une colonne TosoHaas TSK Prep G 3000 SW, d'un diamètre de 21,5 mm et d'une longueur de 300 mm, la limite d'exclusion en masse moléculaire est de 500 000 daltons. Le tampon d'élution utilisé contient du phosphate 100 mM, du sulfate de sodium 100 mM, à pH 6,8. La séparation du mélange de protéines a été effectué en 60 min. Seule la fraction correspondant à une masse de 15-20 000 daltons a été conservée. Cette fraction est dialysée dans un tampon Tris 20 mM contenant du CaCl_2 0,2 mM, pH 7,2, puis lyophilisée.

A chaque étape, seules les fractions présentant une activité toxique significative ont été retenues pour l'étape suivante. Un contrôle de l'activité toxique des protéines a été effectué à chaque étape, à l'aide du test MTT. Seules les fractions présentant une activité toxique significative ont été retenues pour l'étape de purification supplémentaire décrite dans l'exemple 3.

Exemple 3 : Purification supplémentaire des protéines urinaires par chromatographie phase inverse.

Des pools d'urine provenant de patients SEP (pool SEP positif) et de patients non SEP (pool SEP négatif), obtenus après purification selon l'exemple 2, ont été repris dans de l'eau distillée, puis dilués avec une solution 0,2% TFA/10% acétonitrile pour obtenir une concentration finale d'environ 130 à 140 $\mu\text{g/ml}$.

La séparation par HPLC phase inverse C8 a été effectuée sur une colonne Brownlee Aquapore (nom commercial) commercialisée par la société Perkin Elmer (caractéristiques de la colonne : 300 angstroms/7 μm /(100x4,6) mm). Deux colonnes distinctes ont été utilisées respectivement pour les pools positif et négatif. Les injections ont été réalisées par multi-injections de 250 μl . Les protéines ont été éluées avec un gradient linéaire de 5% à 15% de tampon B en 5 min., puis de 15% à 100% de tampon B en 95 min., à un débit de 0,5 ml/min. Les tampons de séparation A et B utilisés sont respectivement le tampon 0,1% TFA (Pierce n° 28904)/ eau MilliQ et le tampon 0,09% TFA/80% acétonitrile (Baker). La détection a été effectuée par mesure de l'absorbance UV à 205 et 280 nm. La collecte des fractions a été effectuée en fractions de 1,5 ml et de 0,5-1 ml dans la zone d'intérêt. Les fractions ont été congelées après la collecte dans de la carboglace.

Les fractions collectées ont ensuite été séchées en speed vac et reprises dans 100 µl de 0,1% TFA/30% acétonitrile. 20µl des fractions ont été transférés dans des eppendorfs de 500 µl, séchés et lavés à deux reprises avec 100 µl d'eau MilliQ, puis séchés de nouveau.

5 L'activité toxique des protéines contenues dans chaque fraction recueillie après élution a été déterminée à l'aide du test MTT. Seule la fraction 21 présentant une activité toxique significative a été retenue. Le numéro de cette fraction correspond à l'ordre de l'élution en fonction des conditions d'élution énoncée dans cet exemple.

10 Exemple 4: Analyse des protéines obtenues par séparation sur HPLC sur gel SDS-TRICINE.

Le pool de collecte de la fraction 21 obtenue par HPLC, comme décrit dans l'exemple 3, et provenant de 20 injections du pool SEP positif, a été déposé sur un gel SDS-TRICINE 16% précoulé de 10 puits et de 1 mm d'épaisseur (commercialisé
15 par la société Novex). Les conditions d'utilisation du gel correspondent à celles préconisées par le fournisseur. L'échantillon est repris dans 75 µl du tampon d'échantillon 1 fois concentré (SDS-TRICINE N° LC 1676, 1 ml deux fois concentré + 50µl de β-mercaptoéthanol (Pierce) dilué au 1/2 dans de l'eau) et 25µl de l'échantillon sont déposés sur le gel en trois fois. Le pool de collecte de la fraction 21 provenant de 6
20 injections du pool SEP négatif a été déposé sur le gel dans les mêmes conditions que celles décrites pour le pool SEP positif. La migration sur les deux gels a été effectuée en parallèle dans la même cuve de migration (XCELL II NOVEX (nom commercial)) à un voltage constant de 125 mV pendant 2 heures. La cuve est placée dans un bac contenant de la glace. Les gels ont été colorés directement après la migration par
25 coloration au zinc/imidazole (kit de coloration 161-0440 commercialisé par la société BIORAD) pour obtenir une coloration négative réversible. Les bandes de protéines sont translucides sur fond opaque.

Exemple 5 : Digestion à la trypsine des bandes de gel.

30 Toutes les bandes de protéines visualisées dans les dépôts de la fraction 21 ont été découpées et soumises à une protéolyse par la trypsine.

Les bandes de gels sont découpées au scalpel en tranches de 1 mm et transférées dans des tubes eppendorfs. Les eppendorfs sont soumis à un pic de centrifugation pour faire tomber les morceaux de gel et après centrifugation 100 µl de tampon de lavage (100 mM NH_4CO_3 /50% CH_3CN) sont ajoutés aux morceaux de gel.

5 Après 30 min. d'agitation à température ambiante, le surnageant est enlevé par fractions de 20 µl et l'étape de lavage est renouvelée deux fois. Les eppendorfs sont séchés pendant 5 min. en speed vac. 20 µg de trypsine (Modified sequenal grade PROMEGA V5111) sont repris dans 200 µl de tampon de digestion (5 mM TRIS, pH 8) et sont dissous pendant 30 min. à température ambiante, sous agitation intermittente

10 et 20 à 30 µl de trypsine resuspendue sont ajoutés aux morceaux de gel. Les eppendorfs sont centrifugés et conservés en chambre chaude à 28°C pendant une nuit. Après digestion les bandes de gel peuvent être utilisées immédiatement pour les mesures de masse ou congelées pour usage ultérieur.

15 Exemple 6 : Digestion chimique au CNBR des bandes de gel.

Dans l'éventualité d'une protéine résistante aux clivages enzymatiques, en particulier à l'action de la trypsine comme décrit dans l'exemple 5, les bandes entre 16kD et 20kD ont été traitées avec du CNBR. Les bandes de gel, déjà utilisées pour les digestions avec la trypsine, sont séchées 5 à 10 min. en speed vac.

20 Une solution de CNBR (FLUKA) à 200 mg/ml a été préparée dans 70 % acide formique (BAKER). 20 µl de cette solution ont été utilisées pour réhydrater les morceaux de gel. La réaction s'est faite pendant 20 h à température ambiante et à l'obscurité. Les peptides sont extraits 3 fois 30 min. avec 100 µl de 0.1 % TFA / 60% Acétonitrile. Les solutions d'extraction sont réunies et concentrées à 20 µl. Ces

25 échantillons sont dilués 5 fois dans 0,1 % TFA/eau. Les conditions de séparation sont celles décrites pour les peptides de la digestion avec la trypsine.

Exemple 7 : Analyse par spectrométrie MALDI-TOF.

30 µl de tampon d'extraction (2 % TFA/50 % acétonitrile) sont ajoutés

30 aux échantillons. Les eppendorfs à analyser sont soumis à une centrifugation de 5 min., puis à une sonication de 5 min. et finalement à une centrifugation de 1 min.

Sur un disque en acier inoxydable, 14 dépôts de 0,5 µl de matrice (acide α-cyano-4-hydroxy-trans-cinnamique à saturation dans de l'acétone) sont réalisés. Une fine couche microcristalline uniforme est obtenue. 0,5 µl d'une solution de 2 % TFA/eau sont déposés sur cette sous-couche sur les 14 dépôts, puis 0,5 µl d'échantillon à analyser sont ajoutés. Dans cette goutte ainsi formée, 0,5 µl d'une solution à saturation d'acide d'acide α-cyano-4-hydroxy-trans-cinnamique dans 50 % acétonitrile/eau sont ajoutés. Après un séchage à température ambiante pendant 30 min., les dépôts cristallins sont lavés avec 2 µl d'eau qui sont immédiatement évacués par un soufflé d'air. Tous les spectres sont obtenus sur un spectromètre de masse BRUKER BIFLEX (marque de commerce) équipé d'un réflectron. Les mesures (90 à 120 tirs laser sur l'ensemble du dépôt) sont accumulées pour obtenir un spectre de masse qui soit le plus représentatif de l'ensemble des peptides présents dans le sandwich matrice-échantillon. Pour chaque dépôt, une calibration avec les peptides de l'autolyse de la trypsine a été faite afin de pouvoir utiliser une précision de mesure inférieure à 100 ppm.

Les recherches dans les banques de données ont été exécutées dans MS-FIT PROTEINPROSPECTOR (<http://prospector.ucsf.edu>). Les paramètres communs, utilisés dans ces recherches, sont (1) base de données : NCBIInr, (2) une tolérance de 100-50 ppm, (3) les cystéines ne sont pas modifiées, (4) les méthionines peuvent être oxydées, (5) gamme de poids moléculaire : 1000-100000 Da, (6) jusqu'à 3 sites de coupure peuvent être ignorés.

Exemple 8 : Séquençage N-terminal des peptides de digestion.

(i) Extraction et séparation par HPLC des peptides de digestion.

Après les mesures de masse sur la totalité de la digestion, le reste des peptides est extrait en 3 fois 30 min. dans un bain de sonication avec 0,1 % TFA/60 % acétonitrile. Les solutions d'extraction sont réunies et séchées jusqu'à 20 µl en speed vac. Après dilution dans 80 µl de tampon A (0,1 % TFA/eau), les extractions des bandes de gel, digérées avec de la trypsine, sont injectées sur une colonne C18/MZ-Vydac/(125x1.6)mm/5 µm. L'élution des peptides se fait à un débit de 150 µl/min. et dans un gradient allant de 5 % de tampon B (0,09 % TFA/80 % acétonitrile) à 40 % de tampon B en 40 min., puis de 40 % de tampon B à 100 % de tampon B en 10 min. La

détection est faite par mesure de l'absorbance UV à 205 nm. La collecte des pics est effectuée dans des tubes eppendorf de 500 µl. Les fractions sont conservées sur la glace et pour la bande de 18-20 kD du pool 21 SEP positif analysées par spectrométrie de masse MALDI-TOF.

5 (ii) Séquençage N-terminal.

Les fractions ne correspondant qu'à un seul pic de masse ont été analysées par dégradation d'Edman sur un séquenceur (Modèle 477A PERKIN ELMER/Applied Biosystems). Les conditions de séquençage sont celles décrites par le constructeur. Une micro cartouche a été utilisée pour le dépôt des échantillons et les PTH-AminoAcid
10 sont identifiés avec un système HPLC online (Modèle 120A PERKIN ELMER/Applied Biosystems).

Le dépôt de la fraction à séquencer s'est fait en plusieurs dépôts de 15 µl avec des séchages intermédiaires. Le tube ayant contenu le peptide est lavé avec 15 µl d'acide formique 85 % (BAKER). Les séquences d'acides aminés correspondent
15 toujours aux masses mesurées. Les peptides, dont les masses ne correspondent pas à la protéine principale identifiée, ont été séquencés en priorité. De cette manière, il a été possible d'identifier jusqu'à trois protéines dans une bande de gel.

Exemple 9 : Résultats et discussion.

20 Après HPLC inverse du pool témoin SEP négatif et du pool SEP positif, l'activité toxique de chaque fraction d'élution a été déterminée en utilisant le test MTT. Seule la fraction 21 du pool SEP positif présente une activité toxique *in vitro*. La fraction 21 du pool témoin SEP négatif ne présente aucune activité toxique. L'activité toxique de la fraction 21 du pool SEP positif a été confirmée *in vitro* par FACS, comme
25 décrit dans la demande de brevet WO 98/11439 sur des cellules astrocytaires murines.

Le contenu protéique de la fraction 21 du pool témoin SEP négatif et du pool SEP positif a été observé après séparation sur gel SDS-TRICINE 16% et coloration du gel au zinc/imidazole. Des protéines de poids moléculaires apparents élevés ont été trouvées dans les deux fractions. Par contre cinq bandes différentes et de
30 poids moléculaires apparents faibles ne sont visibles que dans la fraction 21 du pool SEP positif (bandes 8, 14, 18 et 20 kD). A chaque bande correspond au moins une protéine et des variants desdites protéines qui ont un poids moléculaire apparent proche

de celui de la protéine native. Ces séquences variantes présentent un pourcentage d'homologie ou d'identité avec les séquences natives d'au moins 70%, de préférence d'au moins 80% et avantageusement d'au moins 98 %.

Les protéines d'intérêt de la fraction 21 du pool SEP positif ont ensuite été
5 analysées par spectrométrie de masse et/ou séquençage et recherche d'homologie dans les banques de données. Les résultats montrent la présence de cinq bandes de protéines migrant entre 22 et 5 kD dans la fraction 21 du pool SEP positif et des variants desdites protéines.

Ces protéines sont le fragment C-terminal du Perlecan, qui commence à
10 l'acide aminé 3464 et se termine à l'acide aminé 3707 de la séquence protéique complète, identifiée dans l'identificateur de séquences SEQ ID N° 2, le précurseur de la protéine plasmaticque de liaison au rétinol dont la séquence est donnée en SEQ ID N° 4, le précurseur de l'activateur du ganglioside GM2 identifié en SEQ ID N° 8, la calgranuline B identifiée en SEQ ID N° 17 et la saposine B représentée en SEQ ID N°
15 24. Comme décrit ci dessus des homologues ou variants desdites protéines ont également été identifiés par séquençage. Ces séquences protéiques homologues ou variantes sont le produit de mutations au niveau des gènes codant pour lesdites protéines. A titre d'exemple, la SEQ ID N° 9 présente 99 % d'homologie ou d'identité avec la SEQ ID N° 8 du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2 et le fragment
20 de SEQ ID N° 9 qui commence à l'acide aminé 34 et se termine à l'acide aminé 202 présente 98,88 % d'homologie ou d'identité avec le fragment correspondant de la protéine native identifiée en SEQ ID N° 8.

Exemple 10 : Mise en évidence des protéines dans un échantillon urinaire.

25 Des échantillons d'urine provenant d'un individu SEP négatif et d'un patient SEP positif ont été prélevés. Ces échantillons d'urine ont été purifiés selon le protocole décrit précédemment. Les fractions d'élution finales 21 ont été analysées séparément par spectrométrie de masse. Le profil de masse de chaque fraction correspondant à chaque échantillon d'urine a été comparé au profil de masse obtenu
30 pour les protéines identifiées dans les exemples précédents. Les résultats montrent que pour l'échantillon d'urine provenant du patient SEP positif les masses correspondent aux molécules (i) fragment C-terminal du Perlecan, (ii) précurseur de la protéine

activatrice du ganglioside GM2, (iii) calgranuline B et (iv) saposine B identifiées précédemment. Par contre aucune de ces masses n'a été identifiée dans le profil de masse obtenu après analyse de l'échantillon d'urine provenant de l'individu SEP négatif. Le procédé décrit est utilisable comme essai de diagnostic.

5

Exemple 11 : Essai en Western Blot.

Des Western Blot ont été réalisés sur différentes fractions d'urine brute ou purifiée comme décrit dans l'exemple 2. Des échantillons d'urine provenant d'individus sains et de patients atteints de sclérose en plaques sont testés en parallèle.

10 Les échantillons sont déposés sur un gel d'électrophorèse permettant de séparer les différentes protéines en fonction de leur masse moléculaire sous l'action d'un champ électrique. Les Western Blot sont réalisés après transfert des protéines du gel sur une membrane. Pour révéler les protéines transférées, la membrane est saturée en tampon de saturation, puis incubée avec un anticorps directement marqué à la phosphatase

15 alcaline. L'anticorps utilisé est un anticorps anti-calgranuline (anticorps monoclonal de souris, clone CF 145 sous-type IgG 2b commercialisé par la société Valbiotech : référence MAS 696p lot PC96G696). Le substrat de l'enzyme est le dichlorure de 3,3'-(1,1'-biphényl)4,4'diazonium et 2-naphtalényle phosphate de sodium (commercialisé sous la dénomination β Naphtyl acid phosphate Sigma réf. N7375 et δ dianisine

20 Tetrazotized D3502) est ajouté pour la révélation des bandes et la visualisation des protéines liées à l'anticorps. Une molécule de masse moléculaire apparente d'environ 14 000 est révélée dans les urines purifiées de patients atteints de SEP, avec un signal relativement intense. Cette protéine correspond à la calgranuline B (masse moléculaire apparente : 14 kD). Par contre, aucun signal n'est observé à partir d'urine d'individus

25 sains. Cette observation confirme la présence de cette protéine spécifiquement dans les urines de patients atteints de SEP et la mise en œuvre d'un procédé de détection utilisant un anticorps reconnaissant la protéine.

Exemple 12 : Production d'anticorps monoclonaux.

30 La production d'anticorps monoclonaux par ascite impose une compatibilité du système H-2 entre l'hybridome et la souris productrice. 20 souris femelles Balb/c, âgées de 6 semaines, subissent une injection de 0.5ml de Pristane (2-6-

10-14 acide tétraméthylpentadécane) dans leur cavité péritonéale, pour la production d'ascite (Porter et al., 1972). Une semaine à 10 jours plus tard, 5.10^6 à 10.10^6 hybridomes dilués dans 0.5ml de tampon stérile NaCl 0,145M, Na_2HPO_4 10 mM, KCl 2.7 mM, KH_2PO_4 1.5 mM à pH 7.4. sont injectés par voie intrapéritonéale. L'ascite apparaît une à deux semaines plus tard. Les liquides d'ascites présents dans la cavité péritonéale sont alors recueillis avec une seringue après incision du péritoine. Le liquide recueilli est centrifugé à 3000g pendant 15 minutes à température ambiante, filtré sur gaze pour éliminer le gras, puis tamponné en ajoutant 1/20^{ème} de son volume de tris-HCl 1M à pH 8.0. Cette méthode permet d'obtenir des quantités d'anticorps 10 fois supérieures à celles obtenues par culture d'hybridomes.

Les immunoglobulines présentes dans le liquide d'ascite sont relarguées par les sels (sulfate d'ammonium ou sulfate de sodium). Le liquide d'ascite est précipité par le sulfate d'ammonium 40%. Après 20 minutes au froid la solution est centrifugée 15 minutes 8000g à 4°C. Le précipité est lavé et resuspendu à froid dans une solution de sulfate d'ammonium 40% puis de nouveau centrifugé. Le nouveau précipité enrichi en IgG est remis en solution dans du tampon PBS et dialysé la nuit contre le tampon Tris-HCl 25 mM, NaCl 150 mM pH 7,4. Parallèlement une colonne d'agarose-Protéine A (ou protéine G) (commercialisée sous forme lyophilisée, Pierce) est lavée extensivement avec le tampon Tris-HCl 25 mM, NaCl 150mM pH7.4. La solution enrichie en IgG est déposée sur la colonne puis la colonne est lavée. Les IgG retenues par la colonne sont éluées à pH acide (glycine 200 mM pH 2.8). Les fractions éluées sont neutralisées avec un volume de Tris-Base 1M pH 10.5. Le contenu en immunoglobulines de chaque fraction recueillie est quantifiée par lecture d'absorbance à 280 nm (ϵ 1%.1cm = 14.0 Prahl et Porter 1968). Les fractions riches sont poolées. Le degré de purification des IgGs poolées est analysé par électrophorèse en gel d'acrylamide en présence de SDS. Les IgGs purifiées sont dialysées une nuit contre le tampon Tris-HCl 25 mM, NaCl 150mM pH7.4, filtrées stérilement, aliquotées et conservées à -20°C. leur concentration finale est déterminée par lecture de l'absorbance à 280 nm ou par dosage micro-BCA. Les peptides immunogènes référencés SEQ ID N° 58, SEQ ID N° 54, SEQ ID N° 55, SEQ ID N° 56, SEQ ID N° 57, SEQ ID N° 58, SEQ ID N° 59 et SEQ ID N° 65 ont été utilisés pour la production d'anticorps monoclonaux, selon le protocole décrit ci dessus. Mais, il est à la portée de l'homme du

métier de définir d'autres protocoles pour la production d'anticorps monoclonaux, par exemple à partir des techniques décrites par Köhler et Milstein et par Galfre G. *et al.* précédemment cités ou des techniques dérivées de celles ci.

5 Production de protéines recombinantes et d'anticorps polyclonaux et monoclonaux.

Protéines recombinantes :

Les protéines recombinantes GM2AP (SEQ ID NO :73) et Saposine B (SEQ ID NO :74) utilisées pour réaliser la gamme étalon de cette étude ont été produites en système procaryote et purifiées à partir des clones de ces deux protéines
10 obtenus dans notre laboratoire en utilisant les méthodes et protocoles bien connus de l'homme de l'art.

Anticorps anti-GM2AP ou anti-Saposine B :

Les anticorps anti-GM2AP ou anti-Saposine B utilisés pour réaliser l'étude ont été soit produits dans notre laboratoire ou donnés généreusement.
15 Des anticorps polyclonaux anti-Saposine B et anti-GM2AP (Li et al, Glycoconjugate, 1984) ont été utilisés pour l'étude (cf les exemples ci-dessous) : ils sont dénommés SAP84 et GM2AP84.

Des anticorps polyclonaux anti-GM2AP ou anti-Saposine B ont été produits et purifiés dans le laboratoire en utilisant les protocoles et méthodes bien connus de l'homme de l'art : 50 µg de protéine GM2AP ou Saposine B procaryote
20 achetée ont été injectés à des lapins aux jours J0, J28 et J56 ; deux injections de rappel ont été réalisés une fois par mois pendant deux mois consécutifs. Les deux anticorps polyclonaux anti-GM2AP et deux anticorps polyclonaux anti-Saposine B ont ainsi été obtenus et leur spécificité vis-à-vis de la protéine recombinante a été vérifiée par
25 Western blot et par Elisa.

Des anticorps polyclonaux anti-peptides GM2AP ou Saposine B ont été produits et purifiés dans le laboratoire en utilisant les protocoles et méthodes bien connus de l'homme de l'art : 75 µg de peptides GM2AP ou Saposine B définis, produits et couplés à KLH dans notre laboratoire ont été injectés aux jours J0, J28 et
30 J56 ; plusieurs boosts ont été réalisés une fois par mois pendant 5 mois consécutifs avec injection de 75 µg à chaque fois. Quatre anticorps polyclonaux anti-peptides GM2AP, quatre anticorps polyclonaux anti-peptides Saposine B et quatre anticorps

polyclonaux de lapins anti-peptides MRP14 ont ainsi été obtenus et leur spécificité vis-à-vis de la protéine recombinante a été vérifiée par Western blot et par Elisa. La séquence des peptides GM2AP, Saposine B et MRP14 choisis sont décrites dans les figures de 1 à 3.

5 Il a été obtenu :

- un anticorps anti-mélange de deux peptides de 13 et 15 acides aminés de GM2AP : 189-190 ; un anticorps anti-peptide de 18 acides aminés de GM2AP : 191-192 (cf. Figure 1),

10 - un anticorps anti-mélange de deux peptides de 13 et 19 acides aminés de MRP14 : 193 ; un anticorps anti-peptide de 17 acides aminés de MRP14 : 195-196 (cf. Figure 2),

- un anticorps anti-mélange de trois peptides de 12, 15 et 15 acides aminés de Saposine B : 74-75 ; un autre anticorps anti-mélange de 3 peptides de 12, 15 et 15 acides aminés de Saposine B : 72-73 (cf. Figure 3).

15 Des anticorps monoclonaux anti-fraction native ont été produits et purifiés dans le laboratoire en utilisant les protocoles et méthodes bien connus de l'homme de l'art. La « fraction native » correspond à la fraction d'élution cytotoxique obtenue à partir du pool des 80 litres d'urine de patients SEP et après purification. C'est la dernière fraction d'élution qui contient les trois protéines GM2AP, Saposine B, MRP14. 30 µg de cette fraction de purification ont été injectés à trois souris aux jours J0, J14, J28 et le prélèvement a été effectué à J38. Après « screening » et fusion cellulaire, protocoles connus de l'homme de l'art pour l'établissement d'hybridomes et d'anticorps monoclonaux, les hybridomes ont été ré-injectés à la souris et le liquide d'ascite a été récupéré 10 jours après. Les anticorps ont été purifiés sur colonne
20 sépharose-Protéine A et la spécificité vis-à-vis de la fraction utilisée pour l'immunisation a été vérifiée par Western blot et par Elisa. Ainsi quatre anticorps monoclonaux ont été obtenus : 19C1A7, 3D3F9, 18C8C5 et 7D12A8.

Exemple 13 : Dosage des protéines MRP14 dans les urines par technique
30 ELISA.

Les protéines MRP14, MRP8 et l'hétérocomplexe MRP8/14 ont été dosés dans des urines humaines en utilisant (i) soit une technique de dosage Elisa selon le

procédé connu de l'homme de l'art et en utilisant les anticorps anti-MRP décrits dans les exemples précédents ; (ii) soit le kit 'MRP Enzyme Immunoassay' commercialisé par BMA Biomedicals AG, Augst, Switzerland, en utilisant les anticorps du kit, le protocole étant réalisé suivant la notice du kit..

5 Détection de MRP14 et MRP8/14 dans des urines.

Les dosages a été réalisés à partir de 17 urines d'individus issus de la population active (TS), de 27 urines de patients atteints de sclérose en plaques (SEP et de 7 urines de patients atteints d'autres maladies neurologiques (AMN).

10 - La figure 4 illustre les taux de MRP8 dosés dans ces urines : alors que la concentration en MRP8 est quasiment nulle dans les urines AMN, il n'y a pas vraiment de différence de distribution entre les urines TS et SEP. Notons cependant que les différences observées sont quasiment négligeables car les concentrations dosées sont extrêmement faibles.

15 - La figure 5 illustre les taux de MRP14 dosés dans les mêmes urines : alors qu'il n'y a pas vraiment de différences de distribution des concentrations entre les urines TS et AMN, les concentrations sont plus élevées dans certaines urines SEP.

20 - La figure 6 illustre les taux d'hétérodimère MRP8/14 dosés dans les mêmes urines : alors qu'il n'y a pas vraiment de différence entre les concentrations des urines TS et AMN, on observe des plus fortes concentrations dans certaines urines SEP, correspondant peut-être à une sous population de patients SEP caractérisée par une activité de la maladie. MRP8/14 dosé dans les urines est un marqueur de l'activité de la maladie SEP caractérisée par un pic d'inflammation).

25 - La figure 7 récapitulative confirme qu'il n'y a pas de différence significative de concentration en MRP8 et en MRP14 entre les urines TS, AMN et SEP, alors qu'une faible différence de concentration en MRP8/14 est observée entre ces urines, cette concentration étant plus élevée en moyenne dans les urines SEP et étant un marqueur de l'activité de la maladie (pic d'inflammation).

30 Exemple 14 : Protocoles ELISA utilisés pour le dosage des protéines GM2AP et Saposine B.

Les protéines GM2AP ou Saposine B ont été dosées dans des urines humaines en utilisant des anticorps polyclonaux anti-GM2AP ou anti-Saposine B ? en

suivant le protocole Elisa décrit par Gardas et al. (Glycoconjugate Journal 1, 37-42, 1984). Les principales étapes sont brièvement décrites ci-dessous :

A chaque étape, les puits d'une microplaque de 96 puits sont remplis avec 200 µl de la solution désignée. Les puits sont d'abord « coatés » avec une solution de GM2AP (protéine recombinante procaryote) diluée à 50 ng/ml dans un tampon carbonate-bicarbonate, pH 9,6. Après incubation une nuit à 4°C, la solution est éliminée et les puits sont lavés quatre fois avec du tampon PBS pH 7,4 contenant du Tween-20 0.05% (PBS-Tween). Les microplaques ainsi coatées sont stockées à 4°C pendant environ 2 semaines.

Les échantillons d'urine à trois dilutions différentes (20x, 40x et 80x ou d'autres dilutions appropriées) sont incubés avec une dilution appropriée de l'anticorps polyclonal de lapin anti-GM2AP ou anti-Saposine B pendant une nuit à 4°C. Une série de dilutions standard d'une protéine recombinante allant de 2,0 à 62,5 ng/ml est utilisée pour réaliser la gamme étalon et sont traitée de la même façon. Toutes les dilutions sont faites en tampon PBS-Tween contenant 1 mg/ml d'ovalbumine. Ainsi, 0,2 ml de chaque solution incubée est ajoutée dans des puits « coatés » en duplicat et les plaques sont laissées pendant 2 heures à température ambiante. Les puits sont alors lavés quatre fois en PBS-Tween et remplis encore avec une solution d'anticorps de chèvre anti-IgG de lapin couplés à la peroxidase et diluée environ 1200 fois. Après une incubation de 2 heures à température ambiante, les puits sont lavés quatre fois en PBS-Tween et remplis e nouveau avec le réactif de coloration. Le réactif de coloration consiste en 100 mg d'acide 2,2'-azino-di-(3-éthylbenzothiazoline) sulfonique et 10µl de 30% de peroxide d'hydrogène pendant une heure à température ambiante et le degré de coloration de chaque micropuits est estimé par lecture d'absorbance à 405 nm.

Une courbe standard est construite en mettant en abscisse la concentration de GM2AP de la gamme étalon ou de Saposine B avec une échelle logarithmique et en ordonné le pourcentage d'absorbance avec une échelle linéaire. Le pourcentage d'absorbance de l'échantillon est le rapport d'absorbance entre l'échantillon d'urine et le contrôle qui contient seulement l'antisérum, sans l'antigène soluble.

Une solution de protéine recombinante GM2AP produite en système procaryote, et de concentration 3 mg/ml est diluée en tampon carbonate 50 mM, pH 9,6 et 50µl sont ajoutés dans chaque puits d'une microplaque à 96 puits, soit 50µl par puits

d'une solution à 0,5 µg/ml. Les plaques ainsi préparées sont incubées une nuit à température ambiante. L'anticorps polyclonal anti-GM2AP produit dans le laboratoire (lapin 79) a été purifié et dilué en tampon PBS-Tween 0,05% en présence de sérum de cheval 10%. Cette solution est diluée au 1/8000^{ème}. La solution est utilisée pour réaliser

5 une gamme étalon avec 8 points de gamme couvrant les concentrations de 0 à 500 ng/ml. Une préincubation est réalisée pendant une nuit à température ambiante entre 100 µl d'anticorps et 100 µl d'échantillon d'urine à doser ou de solution protéine recombinante GM2AP ou Saposine B servant pour la gamme étalon. Après lavage de la microplaque en PBS-Tween, 50µl du mélange d'incubation sont ajoutés par puits, puis

10 incubés pendant deux heures à température ambiante. La microplaque est de nouveau lavée en PBS-Tween, puis 50 µl d'anticorps anti-IgG de lapin couplé à la peroxidase et dilués au 1/5000 sont ajoutés dans chaque micropuits de la plaque et incubés pendant deux heures à température ambiante. Après de nouveaux lavages de la microplaque, 100µl d'OPD sont ajoutés dans chaque puits et incubés pendant 20 minutes à

15 température ambiante. La coloration de chaque puits, proportionnelle à la concentration de GM2AP ou de Saposine B reconnue par l'anticorps spécifique utilisé, est estimée par lecture d'absorbance.

Une solution de protéine recombinante GM2AP ou Saposine B produite

20 en système procaryote, et de concentration 3 mg/ml est diluée en tampon carbonate 50 mM, pH 9,6 et 50µl sont ajoutés dans chaque puits d'une microplaque à 96 puits, soit 50µl par puits d'une solution à 1,5 µg /ml. Les plaques ainsi préparées sont incubées une nuit à température ambiante. Les anticorps polyclonaux anti-peptides GM2AP produits dans le laboratoire (lapin 190 et lapin 191) purifiés sont utilisés seuls ou en

25 mélange dilués au 1/1000 pour chacun en tampon PBS-Tween 0,05% en présence de sérum de cheval 10%. La gamme étalon est réalisée en utilisant de la protéine recombinante procaryote GM2AP ou Saposine B diluée de façon à couvrir la gamme de concentration 0 à 1500 ng/ml avec 8 points. 100 µl d'anticorps (un anticorps ou les deux ensemble) sont pré-incubés en présence de 100µl d'échantillon d'urine à tester ou

30 de solution GM2AP ou Saposine B recombinante, pendant une nuit à température ambiante. Après lavage de la microplaque en PBS-Tween, 50µl du mélange d'incubation est ajouté par puits puis incubés pendant deux heures à température

ambiante. La microplaque est de nouveau lavée en PBS-Tween, puis 50 µl d'anticorps anti-IgG de lapin couplé à la peroxidase, dilués au 1/5000, sont ajoutés dans chaque micropuits de la plaque et incubés pendant deux heures à température ambiante. Après lavage de la microplaque, 100µl d'OPD sont ajoutés dans chaque puits et incubés
5 pendant 20 minutes à température ambiante. La coloration de chaque puits, proportionnelle à la concentration de GM2AP ou Saposine B reconnue par l'anticorps spécifique utilisé, est estimée par lecture d'absorbance.

Exemple 15 : Dosage des protéines GM2AP dans les urines.

10 La protéine GM2AP a été dosée dans les urines de 22 patients atteints de sclérose en plaques (SEP), 5 patients atteints d'autres maladies neurologiques (OND) et 9 individus choisis parmi la population active et recueillies pendant une visite médicale (Healthy), en suivant le protocole Elisa décrit ci-dessous, utilisant des anticorps polyclonaux anti-GM2AP. Les patients SEP sélectionnés pour cette étude sont des
15 patients tout azimut, c'est-à-dire avec différents stades et profils de la maladie, et différents traitements, etc...

Les résultats du dosage sont rapportés dans la figure 8. Alors que seulement 0/5 urines OND et 2/9 urines dites 'Healthy' présentent une concentration en GM2AP supérieure à 200 ng/ml, 10/22 (soit 45%) présentent une concentration
20 supérieure à 200 ng/ml.

Ces résultats indiquent que si la protéine GM2AP est présente en très faible concentration (<400 ng/ml) dans les urines d'individus de la population active, elle est présente en plus forte concentration dans les urines de patients SEP. Cependant 12 urines SEP présentent également des taux faibles de GM2AP. Parmi ces 12 patients,
25 10 sont en traitement. Les fortes concentrations urinaires de GM2AP semblent être un marqueur de la pathologie SEP, et plus précisément un marqueur d'un stade ou d'une forme de la maladie, de l'activité de la maladie, et est certainement influencé par tout traitement en cours. Notons que deux individus de la population active ont des concentrations élevées de GM2AP (ces deux cas ont été inclus volontairement dans
30 l'étude, car ils présentaient tous deux une activité gliotoxique dans leur urines contrairement aux autres individus de cette même catégories). Il est impossible de savoir s'il s'agit d'individus sains, ou atteints d'une pathologie, ou des individus

atteints d'une sclérose en plaques car les échantillons des individus dits « Healthy » ont été prélevés de manière anonyme, sans connaissance du dossier clinique.

Des concentrations urinaires plus élevées de GM2AP sont détectées dans les urines de patients SEP ; une concentration élevée de GM2AP peut être alors un marqueur de la pathologie SEP, et plus précisément d'une forme de la maladie, d'un stade de la maladie, d'une période d'activité, et peut être influencée par tout traitement en cours. Ces concentrations urinaires élevées en GM2AP peut également avoir une valeur prédictive d'un début d'aggravation de la maladie, ou d'une SEP bénigne en début d'évolution, etc

Les valeurs absolues des concentrations GM2AP détectées dans les urines sont dépendantes de l'affinité et de la spécificité de l'anticorps utilisé, mais d'une façon générale, la tendance entre les trois groupes d'individus est conservée quelque soit l'anticorps utilisé.

Exemple 16 : Dosage des protéines Saposine B dans les urines.

La protéine Saposine B a été détectée dans les même échantillons d'urines que ceux utilisés pour l'étude de la détection de GM2AP. Les dosages ont été réalisés en parallèle avec ceux du GM2AP, dans une même étude, en suivant le protocole Elisa décrit ci-dessous, utilisant des anticorps polyclonaux anti-Saposine B.

Les résultats du dosage Saposine B sont reportés dans la Figure 9. 0/5 urines OND et 2/9 urines Healthy présentent une concentration en Saposine B supérieure à 2 µg/ml, alors que 6/22 (soit 27%) présentent une concentration supérieure à 2 µg /ml.

Ces résultats indiquent que la protéine Saposine B est présente dans chaque urine (population dite saine ou population dite malade) à des concentrations non négligeables, c'est-à-dire < 2µg /ml. Ces résultats de dosage sont compatibles avec ceux décrits dans la bibliographie. Cependant même si la Saposine B est présente dans chaque urine, elle semble être présente en plus forte concentration dans certaines urines SEP. Cette augmentation de concentration de saposine B dans les urines Sep est peut-être masquée par la concentration basale de cette protéine à l'état ordinaire. Ainsi les fortes concentrations urinaires de Saposine B semblent être un marqueur de la pathologie SEP, et plus précisément un marqueur d'un stade ou d'une forme de la

maladie, de l'activité de la maladie, et est certainement influencée par tout traitement en cours. La Saposine B dosée seule semble être cependant un marqueur un peu moins discriminant d'une forme ou d'une activité de la maladie que le GM2AP. Notons encore un fois que deux individus de la population active ont des concentrations élevées de Saposine B et que ce sont les deux même individus qui présentaient aussi une forte concentration en GM2AP dans leurs urines.

En conclusion, des concentrations urinaires plus élevées de Saposine B sont détectées dans les urines de patients SEP ; une concentration élevée de Saposine B peut être alors un marqueur de la pathologie SEP, et plus précisément d'une forme de la maladie, d'un stade de la maladie, d'une période d'activité, et peut être influencée par tout traitement en cours. Ces concentrations urinaires élevées en GM2AP peut également avoir une valeur prédictive d'un début d'aggravation de la maladie, ou d'une SEP bénigne en début d'évolution, etc Mais d'une façon générale, les fortes concentrations de Saposine B seules semblent être des marqueurs moins discriminants que les fortes concentrations de GM2AP seules.

Les valeurs absolues des concentrations Saposine B détectées dans les urines sont dépendantes de l'affinité et de la spécificité de l'anticorps utilisé, mais d'une façon générale, la tendance entre les trois groupes d'individus est conservée quelque soit l'anticorps utilisé.

Exemple 17 : Co-dosage des protéines GM2AP et Saposine B dans les urines.

La Figure 10 reporte les concentrations de GM2AP dosée dans les échantillons d'urine décrites dans la Figure 5 par rapport à la concentration de Saposine B dosée dans ces mêmes échantillons et décrite dans la Figure 6. Dans ce graphe sont reportés les échantillons SEP (losanges foncés) et les échantillons OND et 'Healthy' (losanges blancs).

Sur ce graphe, il apparaît clairement que :

- plus la concentration en GM2AP est élevée dans les urines, plus la concentration en Saposine B est élevée. (Nous avons montré que ce n'est pas un cas général avec d'autres protéines et que cela ne traduit pas une perturbation rénale, avec le dosage de la créatinine en parallèle pour chacun des échantillons testés.) ;

- les concentrations élevées de GM2AP et Saposine B sont caractéristiques des échantillons SEP (à l'exception des deux urines de la population active, mentionnées ci-dessus). Ces concentrations élevées conjointes de GM2AP et Saposine B sont des marqueurs de la pathologie SEP, plus précisément d'une fenêtre de la maladie (quadrant à droite et en haut du graphe).

En conclusion, cette analyse confirme que des concentrations urinaires élevées de GM2AP (>400 ng /ml) et de Saposine B (>2 µg /ml) sont co-détectées dans les urines de patients SEP et peuvent représenter des marqueurs de la pathologie SEP, plus précisément d'une forme de la maladie, d'un stade de la maladie, d'une période d'activité, et peuvent être influencée par tout traitement en cours. Il est avantageux de doser les deux protéines en parallèle dans chaque échantillons, et de considérer les deux concentrations.

Dosage de GM2AP et Saposine B dans l'urine de deux patients en cinétique.

Patient SEP n°1 - Forme Rémittente Progressive.

Des urines de ce patients ont été prélevées au cours de l'évolution de sa maladie. Le patient a été hospitalisé à J0 pour une poussée. Il a subi à J1 un flash de corticoïdes puis a été suivi dans le temps d'un point de vue clinique (le flash a apporté une amélioration clinique). La figure 11 montre le profil de dosage du GM2AP et de la Saposine B dans ces urines au cours de l'évolution, et la figure 12 montre le profil du produit des deux concentrations en GM2AP et Saposine B, traduisant une co-détection de concentrations élevées. Les concentrations en GM2AP et Saposine B élevées au moment de la poussée et de l'hospitalisation, diminuent progressivement dans le temps après le flash de corticoïdes jusqu'à 90 jours.

Patient SEP n°2 - Forme Progressive.

Des urines de ce patients ont été prélevées au cours de l'évolution de sa maladie. Le patient a été hospitalisé à J0 pour une poussée. Il a subi à J1 un flash d'Endoxan puis a été suivi dans le temps d'un point de vue clinique (le flash a apporté une amélioration clinique et à J60, des signes d'aggravation de la maladie ont été observés). La figure 13 montre le profil de dosage du GM2AP et de la Saposine B dans ces urines au cours de l'évolution, et la figure 14 montre le profil du produit des deux concentrations en GM2AP et Saposine B, traduisant une co-détection de concentrations

élevées. Les concentrations en GM2AP et Saposine B élevées au moment de la poussée et de l'hospitalisation, diminuent progressivement dans le temps après le flash d'Endoxan (ou encore appelé cyclophosphamide) jusqu'à 23 jours et semblent augmenter pour devenir élevées à J60, montrant ainsi une parfaite corrélation avec l'évolution des signes cliniques.

Ces résultats confirment que :

- des concentrations fortes de GM2AP et Saposine B dans les urines sont des marqueurs de la pathologies SEP, et en particulier la co-détection des fortes concentrations des deux protéines conjointement (traduit par le produit des deux concentrations) ;

- les fortes concentrations de GM2AP et Saposine B dans les urines sont des marqueurs de l'activité de la maladie (ici pendant la poussée) ou sont des marqueurs influencés par les traitements immuno-suppresseurs comme les corticoïdes ou l'Endoxan qui abaissent les concentrations.

Cet exemple illustre le fait que ces marqueurs peuvent être utilisés entre autres :

- pour réaliser un suivi thérapeutique d'un patient et évaluer le bénéfice thérapeutique d'un traitement pour un patient donné ; ou

- de prédire une aggravation de la maladie, prédire un pic d'activité, etc...

- de décider une (re)prise thérapeutique anticipée sur les signes cliniques

Exemple 18 : Corrélation ente la détection des protéines MRP14, GM2AP et Saposine B dans les urines et la gliotoxicité mesurée dans ces urines.

Afin de vérifier une corrélation entre la présence de ces protéines seules ou en combinaison dans les urines et la gliotoxicité des urines, ont été dosées en parallèle les concentrations en protéine d'intérêt et la gliotoxicité d'un échantillonnage d'urines de patients atteints de sclérose en plaques (SEP), de patients atteints d'autres maladies neurologiques (OND) et d'individus issus de la population active dit « Healthy ». Parmi les patients SEP, on note des patients avec différentes formes et stades de la maladie, sous traitement ou non, à différentes activités de la maladie.

Les protéines MRP, GM2AP et Saposine B ont été dosées dans des urines humaines en suivant les protocoles Elisa décrits ci-dessus. Les dosages analysés dans

cet exemples sont ceux décrits dans les exemples précédents. Chaque échantillon d'urine analysé en Elisa a été analysé par le test MTT pour mesurer la gliotoxité de chaque échantillon. La gliotoxité est exprimée en pourcentage de cellules mortes (estimé par colorimétrie en utilisant les sels de tetrazolium) d'une lignée cellulaire astrocytaire murine (CLTT1.1) après 48 heures d'incubation en présence d'urine centrifugée.

La figure 15 représente la concentration en GM2AP en fonction de la gliotoxité des urines déterminée par test MTT.

22 urines SEP (losanges gris), 5 urines AMN (losanges noirs) et 9 urines dites « Healthy » (losanges noirs) ont été reportés sur le graphe. Ce sont les mêmes urines qui ont été étudiées dans les exemples 15 et 16. On observe que toutes les urines témoins (OND et Healthy) ont des taux en GM2AP faibles (<400 ng/ml) et une gliotoxité faibles (<15%), à l'exception d'une urine témoin Healthy (déjà commentée dans l'exemple 15) pour laquelle on observe une forte concentration en GM2AP et une gliotoxité.

Les urines SEP sont réparties en trois sous-populations :

- urines à faible concentration en GM2AP (<400 ng /ml) et faible gliotoxité (<15%),
- urines à faible concentration en GM2AP (<400 ng /ml) et gliotoxité (>15%), soit essentiellement 3 urines,
- urines à forte concentration en GM2AP (>400 ng /ml) et forte gliotoxité (>15%).

Ces trois sous populations traduisent peut-être des sous populations SEP, c'est-à-dire différentes formes ou stades de la maladie, différentes activités de la maladie, différents bénéfices thérapeutiques,

Cependant on peut noter que toutes les urines présentant une forte concentration en GM2AP présentent également une forte gliotoxité.

En conclusion : on observe une corrélation entre concentration urinaire élevée en GM2AP et gliotoxité (toutes les urines avec une forte concentration en GM2AP sont gliotoxiques (10/10), et toutes les urines avec une faible concentration en GM2AP ne sont pas gliotoxiques (<15%), à l'exception de 3 urines/12 SEP). Ceci traduit l'implication de la protéine GM2AP dans le mécanisme de gliotoxité, seule ou

en combinaison, sous sa forme naturelle ou modifiée, mais reconnaissable par un anticorps anti-GM2AP. De plus la co-détection d'une forte concentration en GM2AP dans les urines et d'une forte gliotoxité corrèle avec une sous population de patients atteints de SEP.

5 La figure 16 représente la concentration en Saposine B en fonction de la gliotoxité des urines déterminée par test MTT.

22 urines SEP (losanges gris), 5 urines AMN (losanges noirs) et 9 urines dites «Healthy » (losanges gris clair) ont été reportés sur le graphe. Ce sont les mêmes urines qui ont été étudiées dans les exemples 15 et 16. On observe que plus les urines
10 sont riches en Saposine B, plus elles sont gliotoxiques. Il y a une corrélation assez nette entre concentration de Saposine B et gliotoxité des urines.

En conclusion : on observe une corrélation entre concentration urinaire élevée en Saposine B et gliotoxité. Ceci traduit l'implication de la protéine Saposine
15 B dans le mécanisme de gliotoxité, seule ou en combinaison, sous sa forme naturelle ou modifiée mais reconnaissable par l'anticorps anti-saposine B utilisé pour le dosage.

La figure 17 représente le produit des concentrations en GM2AP et Saposine B en fonction de la gliotoxité des urines déterminée par test MTT.

20 Les 22 urines SEP (losanges gris), 5 urines AMN (losanges noirs) et 9 urines dites «Healthy » (losanges gris clair) des exemples 15 et 16 ont été reportés dans la figure 17. La gliotoxité de ces urines est analysée en fonction du produit des concentrations en GM2AP et Saposine B, c'est-à-dire en fonction de la co-détection des deux protéines dans les urines. On observe très nettement une corrélation entre le
25 produit des deux concentrations GM2AP et Saposine B et la gliotoxité, bien plus importante qu'en ne considérant qu'une seule protéine. On observe que 5/5 des urines OND ont un produit de concentration GM2AP et Saposine B faible et une gliotoxité faible ; 8/9 urines « Healthy » ont un produit de concentration GM2AP et SaposineB faible et/ou une gliotoxité faible. Par contre, on distingue essentiellement trois sous-
30 populations d'urines SEP :

- urines à faible concentration en GM2AP.Saposine B et faible gliotoxité (<15%),

- urines à forte concentration en GM2AP. Saposine B et forte gliotoxicité (>15%).

Ces deux sous populations traduisent peut-être des sous populations SEP, c'est-à-dire différentes formes ou stades de la maladie, différentes activités de la maladie, différents bénéfices thérapeutiques, Cependant il est très important de noter que toutes les urines présentant une forte concentration en GM2AP et Saposine B, c'est-à-dire ayant conjointement une forte concentration en GM2AP et Saposine B, présentent également une forte gliotoxicité. Les deux sous populations de patients SEP sont d'autant plus marquées et nettes que l'on considère conjointement les trois marqueurs : gliotoxicité, concentration élevée en GM2AP et concentration élevée en Saposine B. Ceci est confirmé à la figure 18.

En conclusion : on observe une corrélation entre concentration urinaire élevée de GM2AP et Saposine B et Gliotoxicité. Toutes les urines avec une forte concentration en GM2AP et Saposine B sont gliotoxiques, et toutes les urines avec une faible concentration en GM2AP et Saposine B ne sont pas gliotoxiques (<15%), à l'exception de 2 urines/22 SEP. Ceci traduit l'implication des deux protéines GM2AP et Saposine conjointement ou en combinaison dans le mécanisme de gliotoxicité, sous leur forme naturelle ou modifiée mais reconnaissable par les anticorps anti-GM2AP et anti-saposine B utilisés pour le dosage. De plus la co-détection d'une forte concentration urinaire en GM2AP et Saposine B et d'une forte gliotoxicité corrèle avec une sous population de patients atteints de SEP (stade, forme, activité, traitement de la maladie ?), par rapport à une autre sous population. Ces trois marqueurs considérés conjointement permettent de discriminer entre deux sous populations de patients SEP.

Evolution de la gliotoxicité et des concentrations en GM2AP et Saposine B en fonction de l'évolution de la maladie de deux patients après et pendant traitement.

La corrélation entre gliotoxicité, forte concentration en GM2AP ET Saposine dans les urines et pathologie SEP a également été confirmée en mesurant ces trois paramètres dans l'urine de deux patients au cours de l'évolution de leur maladie.

Patient n°1 : SEP forme rémittente-progressive, hospitalisé à J0 pour une poussée et ayant reçu un flash de corticoïde à J1. Après le flash, il a montré une amélioration clinique jusqu'à J90 - (cf. figures 11,12),

Patient n°2 : SEP forme progressive, hospitalisé à J0 pour une poussée et ayant reçu un flash d'Endoxan (encore appelé cyclophosphamide) à J1. A J60, il présente de nouveaux des signes cliniques d'aggravation de sa maladie - (cf. figures 13,14).

5 Pour les deux patients, il a été montré :

- une corrélation entre la gliotoxicité urinaire et l'évolution clinique de la maladie (lorsque les signes cliniques sont sévères, la gliotoxicité est élevée ; lorsque les signes cliniques diminuent suite au traitement, la gliotoxicité diminue et devient stationnaire ; lorsque les signes d'aggravation apparaissent après le traitement, la
10 gliotoxicité semble augmenter de nouveau),

- une corrélation entre le taux de gliotoxicité dans les urines de patients et les concentrations de GM2AP et Saposine B, et

- une corrélation entre les concentrations élevées de GM2AP et Saposine B et l'évolution clinique de la maladie.

15 En conclusion : le dosage des protéines GM2AP ET Saposine B dans les urines est un bon marqueur discriminatif d'une sous population de la SEP (stade, forme, activité, traitement de la maladie). Les protéines GM2AP et/ou Saposine B sont impliquées dans le mécanisme de gliotoxicité, seules ou en combinaison, sous leur forme naturelle ou sous une forme reconnaissable par les anticorps polyclonaux utilisés
20 pour leur dosage. Comme les protéines GM2AP et Saposine sont co-détectées en forte concentration dans les urines gliotoxiques, il est possible que ces deux protéines agissent en combinaison pour induire la gliotoxicité.

Exemple 19 : Analyse immunohistochimique de l'expression des protéines
25 GM2A, SAPB, MRP14 et MRP8 dans un système de culture producteur de gliotoxine in vitro (cultures de monocytes), ainsi que dans le tissu cérébral normal et pathologique de SEP et de témoins.

Protocole : Des cultures de monocytes d'un patient atteint de SEP et d'un témoin sain ont été réalisées en parallèle, selon le protocole présent décrit brièvement.
30 A partir de sang périphérique de ces deux volontaires prélevé sur ACD, les PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) sont isolés sur Ficoll en utilisant la technique connue de l'homme de l'art. Les cellules récupérés (au niveau de l'anneau) sont lavées

deux fois en milieu RPMI. Les cellules sont alors énumérées sur Kova-slide et sont ensemencées en flacon primaire de 25 cm² ou sur lame Labtek (8 cupules) (en permanox) en milieu RPMI supplémenté avec 15% de sérum AB humain à J0. Les cellules sont cultivées sur des lames alvéolées de type « Labtek » afin de disposer d'un support direct pour l'analyse des monocytes qui adhèrent au support et se différencient ultérieurement en macrophages. Pour les lames, 2.10⁶ cellules sont ainsi ensemencées à raison de 0,25 10⁶ cellules/puits. Pour les flacons, 4.10⁶ cellules sont ensemencées à raison de 0,25 10⁶ cellules/puits. A J1, les cellules en suspension sont récupérées et les puits des Labtek ou les flacons sont lavés deux fois en RPMI (au préalable chauffé à 37°C) avant de rajouter du milieu RPMI supplémenté avec 5% de sérum AB humain. A J1, J3, J6, J9, J12 ou 14, J15 le milieu de culture est changé ; les surnageants sont prélevés et les cellules fixées sur lames en utilisant les techniques connues de l'homme de l'art. A chaque changement de milieu, au moins deux lames ont été fixées en paraformaldéhyde et conservées pour l'analyse immunohistochimique.

Composition du milieu : RPMI (500 ml) avec 15ml de glutamate 200 mM, 5 ml de pyruvate de sodium 100 µM, 5 ml d'acides aminés non essentiels (100x), des antibiotiques pénicilline et streptomycine 100 000 U /µl et des anticorps anti-interferon humains à 100 U/µl.

Résultats : Quatre cultures de monocytes *in vitro* ont été ainsi étudiées en cinétique : deux cultures de monocytes issus de sang d'individus contrôles et deux cultures de monocytes issus de patients SEP. A différents temps de la culture (J0, J1, J3, J6, J9, J12,), les surnageants correspondants ont été également récupérés. Une fois la cinétique complétée, les lames correspondant aux différents jours de cultures ont été incubées en présence d'anticorps polyclonaux anti-GM2A, SAP-B, MRP-8 et MRP14. La gliotoxicité de chaque surnageant ainsi récupéré a été estimée par test MTT. La concentration en protéine GM2AP, MRP14 et Saposine B a également été déterminée dans chaque surnageant par protocole Elisa comme décrit dans les exemples 13 et 14.

Les résultats d'immunofluorescence sur cellules fixées sont résumés ci-dessous ; on peut noter :

- une absence d'expression de MRP8 à tous les stades des 2 cultures

- une expression nette de MRP-14 dans la période entre J9 et J15, retrouvée dans les deux cultures, quoique plus forte dans la culture SEP. Cette expression semble corrélérer une étape de différenciation macrophagique.

- une très faible expression (faible intensité et faible nombre de cellules) est observée en début de culture dans la culture témoin et correspond vraisemblablement à la présence physiologique de GM2A dans les lysosomes macrophagiques.

- Dans la culture SEP, une expression beaucoup plus nette de GM2A (plus forte intensité et nombre de cellules plus important) est observée, avec un marquage cytoplasmique relativement homogène entre J3 et J6, disparaît à J9 et est à nouveau notée à J14-J15 avec un marquage intense et localisé à la périphérie cytoplasmique, dessinant le contour interne de la membrane plasmique. Ces observations ne sont pas retrouvées dans l'ensemble des lames témoins.

L'analyse avec le anticorps anti-SAP-B n'a pas permis d'obtenir un marquage immuno-histochimique interprétable.

Dans les cultures de monocytes SEP déjà effectuées, 3/3 ont présenté un pic de gliotoxicité à J9 et 2/3 un pic plus faible à J6. Aucun pic n'étant détecté dans les cultures de monocytes de 2/2 témoins non-SEP analysés en parallèle. De même, le dosage des protéines MRP14, GM2AP et Saposine B dans le surnageant des cultures cellulaires au cours de la cinétique a montré que les protéines SapB et GM2AP sont détectées par Elisa dans les surnageants des monocytes SEP et non dans ceux des monocytes témoins, aux jours J6 et surtout J9 de la culture ; les protéines ne sont pas détectées au-delà de cette cinétique. Notons que les anticorps utilisés pour le dosage peuvent reconnaître les formes physiologiques des protéines, mais également des formes complexées et/ou modifiées.

On constate donc que la période J6-J9 pendant laquelle on observe une gliotoxicité la plus importante dans le surnageant, est couverte par la période J3-J15 pendant laquelle on observe une production moins différenciée du témoin négatif de GM2A dans les cellules avec des fluctuations quantitatives et qualitatives de son expression cellulaire (quantité d'expression et localisation cellulaire).

Exemple 20: Technique d'immunohistologie sur coupes de cerveaux en paraffine.

Les coupes histologique préparées en paraffine sont déparaffinées en xylène et alcool avant de subir un prétraitement qui a pour but de démasquer les antigènes ; ce prétraitement peut correspondre à (i) deux fois 5 minutes sous micro-
5 onde (750W) en présence d'un tampon citrate de sodium, acide citrique, (ii) un traitement à l'acide par incubation 15 minutes dans une solution d'acide périodique 1% ou par incubation 5 minutes dans une solution d'acide formique 99%. Les peroxydases endogènes sont ensuite bloquées par incubation des lames 30 minutes en eau oxygénée
10 1% puis lavage extensif en eau pendant 15 minutes. Le bruit de fond est bloqué en incubant les lames 30 minutes en présence de PBS Triton 0.03%, 10% sérum Donkey (pour les anticorps polyclonaux) ou 10% sérum Goat (pour les anticorps monoclonaux). Un marquage avec l'anticorps primaire est réalisé en appliquant 100 à 200 µl de solution d'anticorps primaire par lame (0.5 à 5 µg /ml selon le titre) dans du
15 PBS Triton 0.03% puis en incubant 2 heures à température ambiante. Les lames sont ensuite rincées 3 fois en PBS-Triton pendant 10 minutes. Un marquage anticorps secondaire est réalisé en utilisant des anticorps biotinylés capables de se fixer spécifiquement aux anticorps primaires, par exemples des anti-IgG de lapin ou anti-IgG de souris dilués dans du PBS-Triton 0.03%. les lames sont lavées et incubées dans une
20 solution pendant 2 heures (2 µl complexe streptavidine-biotine-peroxydes, 1600 µl PBS-Triton 0.03%). Les lames sont de nouveau lavées avant d'être révélées à l'abri de la lumière dans le tampon A puis rincées à l'eau avant observation microscopique. Tampon A pour 5 lames : 25 ml Tris 0.05M pH 7.6, 2.5 ml Imidazole 1M, 15 ml eau stérile, 2 ml DAB 5 mg/ml, 5 ml Nickel d'ammonium 10%, 30 µl H₂O₂ 1%.

25 Les mêmes anticorps ont été utilisés pour une étude immunohistochimique, selon la technique décrite brièvement ci-dessous, sur lames paraffinées obtenues par coupe au microtome de cerveaux prélevés post-mortem de SEP et de témoins décédés de pathologies non-neurologiques.

Les résultats de l'analyse sont résumés ci-dessous :

30 Il n'y a pas de marquage des cerveaux « non-SEP » et SEP dans la substance grise et la substance blanche « normale (non lésée) avec les différents anticorps anti- MRP8, MRP14, GM2A. Une réactivité non spécifique n'a pas permis

d'interpréter les résultats avec l'anticorps anti-saposine B dans cette application immunohistochimique.

Par contre on note, dans les zones de plaques des cerveaux SEP :

- une réactivité anti-MRP14 dans les cellules macrophagiques et microgliales, ayant une distribution relativement homogène sur toute l'étendue des zones de démyélinisation (plaques),
- une plus faible (moins fréquente) réactivité anti-MRP8 liée essentiellement aux infiltrats lymphoïdes périvasculaires
- une nette réactivité anti-GM2A dans les macrophages et microgliocytes des zones de plaques, avec une densité particulière dans les zones constituant le « mur glial » en limite périphérique de plaque. Un marquage de quelques astrocytes a aussi été retrouvé dans les zones de démyélinisation.

Ces différentes observations montrent qu'il existe une hyperexpression particulière des protéines MRP-14 et GM2A dans les cultures de monocytes de SEP produisant une activité gliotoxique dans leur surnageant, ainsi que dans les zones définissant des plaques de démyélinisation dans les cerveaux de SEP. Elles témoignent donc de la réalité de la coïncidence entre leur co-expression anormale, la production d'activité gliotoxique et les lésions de démyélinisation.

De plus, leur production anormale dans le contexte de la SEP, dans les cellules macrophagiques sanguines ainsi que dans celles du cerveau, indique qu'il est fondé de réaliser leur dosage dans les fluides biologiques pour corréler leur quantité avec l'activité lésionnelle et inflammatoire de la SEP.

Exemple 21 : Mesure de l'activité des cellules T par prolifération des cellules T (Sredni et al., 1981).

Les cellules T sont lavées deux fois en milieu de culture pour éliminer toute trace d'IL2 présente dans le milieu initial de culture. Des lymphocytes B (EBV-LCL) ou des monocytes/macrophages pris comme cellules présentatrices de l'antigène, sont irradiées à 10000 rads, lavées deux fois avec du milieu de culture (RPMI). $2 \cdot 10^4$ cellules T ($2 \cdot 10^5$ cellules /ml) et $2 \cdot 10^4$ cellules B autologues irradiées ($2 \cdot 10^5$ cellules /ml) sont incubées ensemble en présence d'une gamme de concentration croissante de

l'antigène sous un volume final de 200 µl dans des micropuits. Après 48 heures de culture à 37°C, 1 µCi de 3H- thymidine dans 50 µl de milieu RPMI est ajouté dans chaque puits. Les cellules T, seules à se diviser, incorporent la thymidine tritiée dans l'ADN. Après 18 heures de culture, les cellules de chaque micropuits sont récoltées sur des pastilles de laine de verre par aspiration. Après lyse osmotique des cellules, la radioactivité incorporée dans l'ADN est absorbée sur les pastilles (cell Harvester 530, Inotech). Chaque pastille séchée est placée dans un tube plastique qui contient 2 ml de scintillant ; la radioactivité adsorbée sur chacune des pastilles est quantifiée dans un compteur bêta à scintillation liquide (LKB Rackbeta 1217). Les résultats sont exprimés comme moyenne arithmétique de cpm/culture ('coups par minute').

Exemple 22 : Protocole de détection de l'association entre les peptides et les molécules d'histocompatibilité (approche APC transformées avec un peptide se fixant au CMH I).

1) Matériel :

Les sources de molécules d'histocompatibilité sont actuellement de deux types principaux : les cellules mutantes et les molécules d'histocompatibilité purifiées.

La cellule mutante utilisée est la cellule humaine T2 qui est un variant de la lignée T1 produite par fusion du lymphome T CEM et du lymphome B 721.174 (Salter and Cresswell Embo J 1986, 5: 943-949). Cette cellule qui est dépourvue de transporteurs de peptides contient des chaînes lourdes de molécules de classe I libres de peptides qui vont pouvoir accepter de peptides exogènes.

Des molécules d'histocompatibilité de classe I purifiées par chromatographie d'affinité à partir de lignées de cellules B humaines transformées par l'EBV peuvent être également utilisées. Dans ce cas les peptides endogènes doivent être éliminés par un traitement avec de l'urée 1.5 M et de la soude 12.5 mM (pH 11.7) pendant 1 heure à 4°C, suivi de leur élimination par une colonne de désalage (PDLO, Pharmacia). Les molécules d'histocompatibilité sont immédiatement remises en présence des peptides à tester dans un tampon PBS avec 0.05% Tween 20, 2 mM EDTA, 0.1% NP40 et 6mM CHAPS, en présence de 2µg/ml B2m pour faciliter la réassociation (Gnjatic et al., Eur J Immunol 1995 25 : 1638-1642).

Les peptides testés ont en général 8 à 10 résidus, parfois 11 ou 12. Ils ont été synthétisés par Néosystems (Strasbourg), ou par Chiron mimotopes (Victoria, Australie). Ils sont utilisés à des concentrations variant de 100 μ M à 0.1 nM.

2) Protocole de l'assemblage (Connan et al., Eur J Immunol 1994, 24 : 777 ; Couillin et al. Eur J Immunol 1995, 25 : 728-732).

Des aliquotes de 8.105 cellules dans un volume de 64 μ l, répartis dans des tubes microfuge Eppendorf, sont mis en présence d'un tampon de lyse contenant 10 mM PBS, pH 7.5 1% NP40, des inhibiteurs de protéases (1 mM PMSF, 100 μ M iodoacétamide, 2 μ g /ml aprotinine, 10 μ M leupeptine, 10 μ M pepstatine et 10 μ g/ml inhibiteur de trypsine). La lyse se fait en présence des peptides à tester pendant 30 minutes ou 1 heure à 37°C. Après élimination du matériel non solubilisé par une centrifugation à 15 000 tours /minute à 4°C, le surnageant est additionné de 140 μ l de PBS contenant 0.05% de Tween 20, 3 mM d'azide de sodium, 1 mM PMSF et 10 mg /ml d'albumine bovine. Chaque échantillon est incubé pendant 20 heures à 4°C dans 2 puits d'une plaque à microtitration de type Nunc,Maxisorb, préalablement recouverts d'un anticorps monoclonal (10 μ g /ml en PBS) qui reconnaît les molécules d'histocompatibilité ayant une(des) conformation(s) conforme(s) pour la présentation de peptides et semblable(s) à celle(s) présente(s) à la surface des cellules. La plaque recouverte d'anticorps est préalablement saturée par de l'albumine bovine à 10 mg /ml dans du PBS-Tween avant la mise de l'échantillon. Le second anticorps qui permet la détection de l'assemblage des molécules d'histocompatibilité est dirigé contre la B2m. Il est couplé soit à la biotine (NHS-LC biotin, Pierce) soit à la phosphatase alcaline (P-552, Sigma) et est incubé à 2 μ g /ml pendant une heure à 37°C. Dans le cas de l'emploi de la biotine, une incubation de 45 minutes à 20-25°C avec de la streptavidine couplée à la phosphatase alcaline (E-2636, Sigma) est réalisée. L'activité de la phosphatase alcaline est mesurée en utilisant comme substrat le 4-méthyl-umbelliféryl-phosphate (M-8883, Sigma) à 100 μ M dans de la diéthanolamine 50 mM, pH 9.5 avec du MgCl₂ 1 mM. La lecture est faite à 340/460 nm à l'aide d'un cytofluorimètre.

3) Stabilité des complexes HLA/peptides :

La stabilité des complexes précités a été étudiée car elle conditionne la bonne présentation de l'antigène et l'induction de la réponse T. A cet effet, on a utilisé soit du HLA purifié, soit le lysat de la cellule T2. Avec le HLA purifié, on a éliminé les

peptides endogènes (comme décrit en 2)) puis on l'a mis en présence du peptide à tester en tube Eppendorf à 37°C, pendant des temps variables de quelques minutes à plusieurs jours. La phase suivante d'incubation sur plaque de 96 puits (comme décrit en 2) avec l'anticorps anti-HLA se fait pendant une heure à 37°C. La révélation est effectuée de
5 manière classique. Avec le lysat de la cellule T2, toutes les incubations sont également faites à 37°C, après ajout de tous les inhibiteurs de protéases.

REVENDICATIONS

1. Utilisation d'au moins un polypeptide comprenant au moins un fragment d'une protéine pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29, et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à SEQ ID N° 8 et SEQ ID N° 10 à SEQ ID N° 29, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B.

2. Utilisation d'au moins deux polypeptides en combinaison, lesdits polypeptides comprenant chacun au moins un fragment d'une protéine, pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à une séquence peptidique choisie parmi SEQ ID N° 1 à SEQ ID N° 8 et SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 29, et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à SEQ ID N° 8 et SEQ ID N° 10 à SEQ ID N° 29, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine

plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B.

3. Utilisation d'au moins un polypeptide comprenant au moins un fragment d'une protéine pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 17 et SEQ ID N° 24 et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 17 et SEQ ID N° 24.

4. Utilisation selon la revendication 3, de cinq polypeptides en combinaison, lesdits polypeptides comprenant chacun au moins un fragment d'une protéine, pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, pronostiquer, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 17 et SEQ ID N° 24 et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 17 et SEQ ID N° 24.

5. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que la séquence peptidique dudit polypeptide comprend une séquence choisie parmi l'une quelconque des SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 17 et SEQ ID N° 24.

6. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que la séquence peptidique dudit polypeptide consiste en une séquence choisie parmi l'une quelconque des SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 17 et SEQ ID N° 24.

7. Utilisation d'un fragment polypeptidique défini dans la revendication 1 ou dans la revendication 3 pour la préparation d'un peptide immunogène, caractérisé en ce que ledit peptide comprend tout ou partie d'au moins une des séquences référencée SEQ ID N° 58 à 65.

5 8. Utilisation d'au moins un fragment nucléotidique, pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, pronostiquer, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, selon laquelle ledit fragment nucléotidique est choisi parmi des fragments qui codent pour au moins un fragment
10 d'une protéine, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ
15 ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29 et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à SEQ ID N° 8 et SEQ ID N° 10 à 29, les fragments complémentaires desdits fragments et les
20 fragments qui codent pour les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisie parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B.

9. Utilisation selon la revendication 8, caractérisée en ce que ledit
25 fragment nucléotidique code pour ladite protéine.

10. Utilisation selon la revendication 9, caractérisée en ce que la séquence peptidique de ladite protéine à l'état natif consiste en une séquence choisie parmi l'une quelconque des SEQ ID N° 1 à 8 et SEQ ID N° 10 à 29 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies
30 parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B.

11. Utilisation d'au moins un fragment nucléotidique pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, pronostiquer, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune selon laquelle ledit fragment est un
5 fragment d'une séquence nucléique choisie parmi l'une quelconque des SEQ ID N° 30, SEQ ID N° 31, SEQ ID N° 32, SEQ ID N° 33, SEQ ID N° 34, SEQ ID N° 35, SEQ ID N° 36, SEQ ID N° 37, SEQ ID N° 38, SEQ ID N° 39, SEQ ID N° 40, SEQ ID N° 41, SEQ ID N° 42, SEQ ID N° 43, SEQ ID N° 44, SEQ ID N° 45, SEQ ID N° 46 et SEQ ID N° 47, SEQ ID N° 48, SEQ ID N° 49 et SEQ ID N° 50, SEQ ID N° 51, SEQ ID N°
10 52, SEQ ID N° 53, SEQ ID N° 54, SEQ ID N° 55, SEQ ID N° 56, SEQ ID N° 57, SEQ ID N° 67, SEQ ID N° 66, SEQ ID N° 69, SEQ ID N° 70 et SEQ ID N° 71 et leurs séquences complémentaires.

12. Utilisation d'un ligand spécifique d'un polypeptide ou d'un fragment nucléotidique selon l'une quelconque des revendications précédentes pour obtenir une
15 composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, pronostiquer, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune. .

13. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que la maladie dégénérative et/ou auto-immune est la sclérose en
20 plaques.

14. Procédé pour détecter au moins une protéine associée à une maladie dégénérative et/ou auto-immune, dans un échantillon biologique, caractérisé en ce que l'on met en contact l'échantillon biologique avec au moins un ligand spécifique d'au moins un polypeptide, ledit polypeptide comprenant au moins un fragment d'une
25 protéine et ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N°
30 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29 et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 %

d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à SEQ ID N° 8 et SEQ ID N° 10 à 29, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B, puis on détecte la formation d'un complexe entre ledit polypeptide et ledit ligand.

15. Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que ledit ligand est un anticorps monoclonal, un anticorps polyclonal, un récepteur, un substrat d'activité enzymatique ou une enzyme dont ledit polypeptide est un cofacteur.

10 16. Procédé pour détecter au moins un ligand associé à une maladie dégénérative et/ou auto-immune, dans un échantillon biologique, caractérisé en ce que l'on met en contact l'échantillon biologique avec au moins un polypeptide comprenant au moins un fragment d'une protéine, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, 15 SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29, les séquences peptidiques qui 20 présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à SEQ ID N° 8 et SEQ ID N° 10 à SEQ ID N° 29, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisie parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique 25 de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B, puis on détecte la formation d'un complexe entre ledit polypeptide et ledit ligand.

17. Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que le ligand est un anticorps, un récepteur, un substrat d'activité enzymatique ou une enzyme dont ledit 30 polypeptide est un cofacteur.

18. Procédé selon l'une quelconque des revendications 14 à 17, caractérisé en ce que la séquence dudit polypeptide comprend une séquence peptidique choisie parmi l'une quelconque des SEQ ID N° 1 à 8 et SEQ ID N° 10 à 29.

19. Procédé selon l'une quelconque des revendications 14 à 17, caractérisé en ce que la séquence dudit polypeptide consiste en une séquence peptidique choisie parmi l'une quelconque des SEQ ID N° 1 à 8 et SEQ ID N° 10 à 29.

20. Procédé selon l'une quelconque des revendications 14 à 19, caractérisé en ce que l'échantillon biologique est l'urine, le liquide céphalo-rachidien ou le sérum.

21. Procédé selon l'une quelconque des revendications 14 à 20, caractérisé en ce que la maladie dégénérative et/ou auto-immune est la sclérose en plaques.

22. Polypeptide caractérisé en ce qu'il comprend au moins un fragment d'une protéine dont la séquence peptidique correspond à SEQ ID N° 9, ledit fragment comprenant au moins une mutation par rapport à la séquence de référence SEQ ID N° 8.

23. Polypeptide selon la revendication 22, caractérisé en ce qu'il comprend au moins deux mutations par rapport à la séquence de référence SEQ ID N° 8.

24. Polypeptide selon la revendication 22, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les polypeptides qui comprennent la séquence en acides aminés FSWDNCFEGKDPVIR, référencée SEQ ID N° 68 et la séquence en acides aminés YSLPKSEFAVPDLELP, référencée SEQ ID N° 72.

25. Polypeptide selon l'une des revendications 22 à 24, caractérisé en ce qu'il comprend une protéine dont la séquence peptidique correspond à SEQ ID N° 9.

26. Polypeptide selon l'une des revendications 22 à 25, caractérisé en ce qu'il consiste en une protéine dont la séquence peptidique correspond à SEQ ID N° 9.

27. Utilisation d'au moins un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 22 à 26 pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, pronostiquer, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune.

28. Utilisation selon la revendication 26, caractérisée en ce que le polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 22 à 26 est utilisé

en mélange avec au moins un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 5.

29. Procédé pour détecter au moins un ligand associé à une maladie dégénérative et/ou auto-immune, dans un échantillon biologique, caractérisé en ce que
5 l'on met en contact l'échantillon biologique avec au moins un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 22 à 26, puis on détecte la formation d'un complexe entre ledit polypeptide et le ligand.

30. Procédé selon la revendication 29, caractérisé en ce que l'on met en
10 contact l'échantillon biologique avec un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 22 à 26 et avec au moins un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 5.

31. Procédé selon la revendication 29 ou 30, caractérisé en ce que ledit
15 ligand est un anticorps, un récepteur, un substrat d'activité enzymatique ou une enzyme dont ledit polypeptide est un cofacteur.

32. Procédé pour détecter au moins un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 22 à 26 dans un échantillon biologique caractérisé
20 en ce que l'on met en contact l'échantillon biologique avec au moins un ligand spécifique dudit polypeptide, puis on détecte la formation d'un complexe entre ledit polypeptide et ledit ligand.

33. Procédé selon la revendication 32, caractérisé en ce que ledit ligand est
25 anticorps monoclonal, un anticorps polyclonal, un récepteur, un substrat d'activité enzymatique ou une enzyme dont ledit polypeptide est un cofacteur.

34. Procédé selon la revendication 30 ou 31, caractérisé en ce que l'on met en contact l'échantillon biologique avec un ligand tel que défini dans l'une quelconque
30 des revendications 31 et 33 et au moins un ligand spécifique d'au moins un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 5, puis on détecte la

formation de complexes entre lesdits polypeptides et lesdits ligands spécifiques desdits polypeptides.

35. Procédé selon la revendication 34, caractérisé en ce que le ligand est
5 un anticorps monoclonal, un anticorps polyclonal, un récepteur, un substrat d'activité enzymatique ou une enzyme dont ledit polypeptide est un cofacteur.

36. Fragment nucléotidique caractérisé en ce qu'il code pour un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 22 à 26.

10 37. Utilisation d'un fragment nucléotidique pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, pronostiquer, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou auto-immune, selon laquelle ledit fragment nucléotidique est le
15 fragment nucléotidique défini dans la revendication 35, éventuellement en association avec au moins un fragment nucléotidique tel que défini dans l'une quelconque des revendications 8 à 11, et les fragments complémentaires desdits fragments.

38. Procédé selon l'une quelconque des revendications 29 à 35, caractérisé
20 en ce que l'échantillon biologique est l'urine, le liquide céphalo-rachidien ou le sérum.

39. Procédé selon l'une quelconque des revendications 29 à 36 caractérisé en ce que la maladie dégénérative et/ou auto-immune est la sclérose en plaques.

25 40. Procédé pour détecter au moins un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou dans l'une quelconque des revendications 22 à 26, selon lequel on prélève un échantillon d'un fluide biologique d'un patient présentant un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune et éventuellement après purification dudit échantillon de fluide
30 biologique, on analyse par spectrométrie de masse le profil de masse obtenu à partir du fluide biologique et on compare à un profil de masse de référence.

41. Utilisation d'au moins un polypeptide comprenant au moins un fragment d'une protéine pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 8, SEQ ID N°9, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29, et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 8 à SEQ ID N° 29, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B, et de préférence SEQ ID Nos :8, 9, 17 et 24.

42. Utilisation, selon la revendication 41, dans laquelle les séquences peptidiques sont comprennent les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le précurseur de l'activateur du ganglioside GM2 et de la saposine B.

43. Utilisation, selon l'une quelconque des revendications 41 ou 42, qui est associée à l'utilisation d'une détection d'une activité gliotoxique.

44. Procédé de diagnostic ou de pronostic dans lequel on dose au moins un polypeptide, selon l'une quelconque des revendications 41 à 43, pour détecter ou prévenir un état pathologique, le dosage permettant d'obtenir une valeur de concentration qui est comparée à une valeur seuil représentative d'une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune.

45. Procédé, selon la revendication 44, dans lequel la valeur seuil est obtenu par un test ELISA pour un échantillon d'urine, cette valeur étant de :

- 400 ng/ml pour le précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, pour l'anticorps GM2AP84, et
- 2 µg/ml pour la saposine B, pour l'anticorps SAPB84.

5 46. Procédé de diagnostic ou de pronostic dans lequel on détecte au moins un polypeptide, selon l'une quelconque des revendications 41 à 43, pour prévenir un état pathologique, la détection s'effectuant dans des cellules ou dans les surnageants desdites cellules d'un patient susceptible d'être atteint par une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune.

10 47. Procédé, selon la revendication 46, dans lequel la détection s'effectue sur des cellules monocytes ou macrophages ou dans les surnageants de ces cellules issues d'un patient susceptible d'être atteint par une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune.

15 48. Procédé, selon l'une quelconque des revendications 46 ou 47, dans lequel la détection s'effectue sur des cellules ou dans les surnageants de ces cellules en culture, après un délai compris entre 6 et 12 jours de culture, préférentiellement après 9 jours.

20 49. Procédé, selon l'une quelconque des revendications 46 ou 47, dans lequel la détection s'effectue sur des cellules, in vivo ou ex vivo, préférentiellement monocytes ou macrophages, dans des cerveaux de patient susceptible d'être atteint par une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune.

25 50. Utilisation ou procédé, selon l'une quelconque des revendications 41 à 49, caractérisée en ce que la maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune est la sclérose en plaques ou bien une forme (progressive, rémittente, rémittente-progressive) ou phase d'activité (poussées) de cette maladie.

30 51. Utilisation d'au moins un polypeptide comprenant au moins un fragment d'une protéine pour tester l'efficacité d'un agent thérapeutique, ladite

protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29, les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisie parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B.

52. Utilisation d'au moins un polypeptide comprenant au moins un fragment d'une protéine pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement d'une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, telle que la sclérose en plaques, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29, les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisie parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline et de la saposine.

53. Utilisation selon la revendication 51 ou 52, caractérisée en ce que le polypeptide est choisi parmi SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24.

54. Utilisation d'au moins un fragment nucléotidique, pour tester
5 l'efficacité d'un agent thérapeutique pour un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, selon laquelle ledit fragment nucléotidique est choisi parmi les fragments qui codent pour au moins un fragment d'une protéine, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ
10 ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29, les séquences peptidiques qui
15 présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et les fragments complémentaires desdits fragments et les fragments qui codent pour les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisie parmi le perlecan, le précurseur de la protéine
20 plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B.

55. Utilisation pour tester l'efficacité d'un agent thérapeutique pour un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, de protéines recombinantes et/ou codées par tout ou partie des fragments
25 nucléotidiques définis à la revendication 54.

56. Utilisation d'au moins un fragment nucléotidique pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement d'une maladie dégénérative
30 et/ou neurologique et/ou auto-immune, telle que la sclérose en plaques, selon laquelle ledit fragment nucléotidique est choisi parmi des fragments qui codent pour au moins un fragment d'une protéine, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la

séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29, les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et les fragments complémentaires desdits fragments et les fragments qui codent pour les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisie parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B.

57. Utilisation pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement d'une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, telle que la sclérose en plaques, de protéines recombinantes et/ou codées par tout ou partie des fragments nucléotidiques définis à la revendication 56.

58. Utilisation selon la revendication 54 ou 56, caractérisée en ce que ledit fragment nucléotidique code pour ladite protéine.

59. Utilisation selon la revendication 58, caractérisée en ce que la séquence peptidique de ladite protéine à l'état natif consiste en une séquence choisie parmi l'une quelconque des SEQ ID N° 1 à 29, les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B.

60. Utilisation selon la revendication 59, caractérisée en ce que les polypeptides sont choisis parmi SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24.

61. Utilisation d'au moins un fragment nucléotidique, pour tester l'efficacité d'un agent thérapeutique pour un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune selon laquelle ledit fragment est un fragment d'une séquence nucléique choisie parmi l'une quelconque des SEQ ID N° 30, SEQ ID N° 31, SEQ ID N° 32, SEQ ID N° 33, SEQ ID N° 34, SEQ ID N° 35, SEQ ID N° 36, SEQ ID N° 37, SEQ ID N° 38, SEQ ID N° 39, SEQ ID N° 40, SEQ ID N° 41, SEQ ID N° 42, SEQ ID N° 43, SEQ ID N° 44, SEQ ID N° 45, SEQ ID N° 46 et SEQ ID N° 47, SEQ ID N° 48, SEQ ID N° 49 et SEQ ID N° 50, SEQ ID N° 51, SEQ ID N° 52, SEQ ID N° 53, SEQ ID N° 54, SEQ ID N° 55, SEQ ID N° 56, SEQ ID N° 57, SEQ ID N° 66, SEQ ID N° 67, SEQ ID N° 69, SEQ ID N° 70, SEQ ID N° 71, et leurs séquences complémentaires.

15

62. Utilisation d'au moins un fragment nucléotidique pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement d'une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, telle que la sclérose en plaques selon laquelle ledit fragment est un fragment d'une séquence nucléique choisie parmi l'une quelconque des SEQ ID N° 30, SEQ ID N° 31, SEQ ID N° 32, SEQ ID N° 33, SEQ ID N° 34, SEQ ID N° 35, SEQ ID N° 36, SEQ ID N° 37, SEQ ID N° 38, SEQ ID N° 39, SEQ ID N° 40, SEQ ID N° 41, SEQ ID N° 42, SEQ ID N° 43, SEQ ID N° 44, SEQ ID N° 45, SEQ ID N° 46 et SEQ ID N° 47, SEQ ID N° 48, SEQ ID N° 49 et SEQ ID N° 50, SEQ ID N° 51, SEQ ID N° 52, SEQ ID N° 53, SEQ ID N° 54, SEQ ID N° 55, SEQ ID N° 56, SEQ ID N° 57, SEQ ID N° 66, SEQ ID N° 67, SEQ ID N° 69, SEQ ID N° 70, SEQ ID N° 71, et leurs séquences complémentaires.

25

63. Utilisation selon la revendication 61 ou 62, caractérisée en ce que la séquence nucléique est choisie parmi SEQ ID N° 30, 31, 42, 53.

30

64. Utilisation de la lycorine pour la préparation d'une composition pour la prévention et/ou le traitement de maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune.

Lapins anti GM2

➤ Ganglioside GM2 activator

2 peptides de 13,15 acides aminés lapins 189 190

1 peptide de 18 acides aminés lapin 191 et 192

MQSLMQAPLL IALGLLLATP AQAHKKPSQ
LSSFWDNCD EGKDPVIRS LTLEPDPIV
PGNVTLSVVG STSVPLSSPL KVDLVLEKEV
AGLWIKIPCT DYIGSCTFEH FCDVLDMLIP
TGEPCEPLR TYGLPCHCPF KEGTYSLPKS
EFVVPDLELP SWLTTGNYRI ESLSSSGKR
LGCikiaASLKGi

GM2A

ATG CAG TCC CTG ATG CAG GGT CCC CTC CTG ATC GCC CTG GGC TTG CTT CTC GCG AGC CCT GCG CAA GCC CAC CTG
M Q S L H Q A P L L I A L G L L L A T L L L A T P A T P A Q A H L
CCA TCC CAG CTC AGT AGC TTT TCC TGG GAT AAC TGT CAT GAA GGG AAG GAC CCT GCG CTG ATC AGA AGC CTG ACT
P S Q L S S S F S W D N C E G K D P A V I R S L T
CCT GAC CCC ATC GTC GTT CCT GGA AAT GTG ACC CTC AGT GTC GGC AGC ACC AGT GTC CCC CTG AGT TGT CCT
P D P I V V P G N V T L S V G S V P L S S P
CTG GAT TTA GTT TTG GAG AAG GAG GTG GCT GCC CTC TGG ATC AAG ATC CCA TGC ACA GAC TAC ATT GGC AGC TGT
V D L V L E K E V A G L W I K I P C T D Y I G S C T F E H F C D V L D M L I P
GAA CAC TTC TGT GAT GTG CAT GAT GAG ATG TTA ATT CCT ACT GCG GAG CCC TGC CCA GAG CCC CTG CGT ACC TAT GGG
E H F C D V L L H L I P T G E P C P E P L R T Y G
TGC CAC TGT CCC TTC AAA GAA ACC TAC TCA CTG CCC AAG AGC GAA TTC GTT GTG CCT GAC CTG GAG CTG CCC
F C H C P F K E G T Y S L P K S E V V P D L E L P
CTC ACC ACC GGG AAC TAC CCG ATA GAG AGC GTC CTG AGC AGC AGT GGG AAG CGT CTG GCG TGC ATC AAG ATC GGT
L T T G N Y R I E S V L S S S G K K R L G C I K I A
CTA AAG GGC ATA
L K G I

FIG. 1

Lapins anti MRP14

2 peptides de 13, 19 acides aminés lapin 193
1 peptide de 17 acides aminés lapin 195-196

MTCKMSQLER NIETIINTFH QYSVKLGHPD
TLNQGEFKEL VRKDLQNFLK KENKNEKVIE
HIMEDDLDTN ADKQLSFEEF IMLMARLTWA
SHEKMHEGDE GPGHHHKPGL GEGTP

MRP1

ATG ACT TGC AAA ATG TCG CAG CTG GAA CGC AAC ATA GAG ACC ATC ATC AAC ACC TTC CAC CAA TAC TCT GTG AAG CTG GGG CAC CCA
M T C K H S Q L E R N I E T I I N T F H Q Y S V K L G H
CTG AAC CAG GGG GAA TTC AAA GAG CTG GTC CGA AAA GAT CTG CAA AAT TTT CTC AAG AAG GAG AAT AAG AAT GAA AAG CTC ATA
L N Q G E F K E L V R K D L Q N F L K K E N K N E K V I E
ATG CAG GAC CTG CAC ACA AAT GCA CAC AAG CAG CTG AGC TTC GAG GAT TTC ATG CTG AAG GGG AGG CTA ACC TGG GGC TCC CAC
M E D L D I N A D K Q L S F E E F I M L M A R L T W A S H
ATG CAC GAG GGT CAC CAG GGC CCT GGC CAC CAT AAG CCA GGC CTC GGG CAG GGC ACC CCC
H H E G D E G P G H H K P G L G E G T

FIG. 2

Lapin anti Saposine

3 peptides de 12,15, 15 acides aminés lapin 74-75
3 peptides de 12,15,15 acides aminés lapin 72-73

GDVCQDCIQM VTDIQTAVRT NSTFVQALVE
HVKEECDRLG PGMADICKNY ISQYSEIAIQ
MMMhMQDQQP KEICALVGFC DEV

Sap
ATG GGG GAC GTT TGC CAG GAC TGC ATT CAG ATG GTG ACT GAC ATC CAG ACT GCT GTA CGG ACC AAC TCC ACC TTT GTC CAG
GCC
M G D V C Q D C I Q M V T D I Q T A V R T N S T F V Q
A
TTG GTG GAA CAT GTC AAG GAG GAG TGT GAC CGC CTG GGC CCT GGC ATG GCC GAC ATA TGC AAG AAC TAT ATC AGC CAG TAT
TCT
L V E H V K E E C D R L G P G M A D I C K N Y I S Q Y
S
GAA ATT GCT ATC CAG ATG ATG CAC ATG CAA CCC AAG GAG ATC TGT GCG CTG GTT GGG TTC TGT GAT GAG TGA
E I A I Q M M M H M Q P K E I C A L V G F C D E *

FIG. 3

4/18

Dosage MRP 8

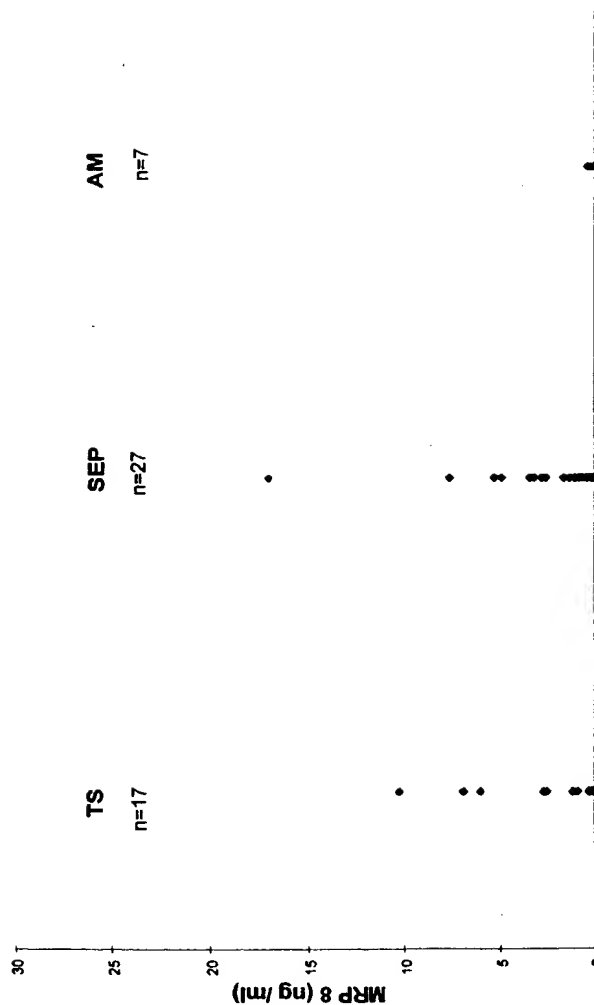
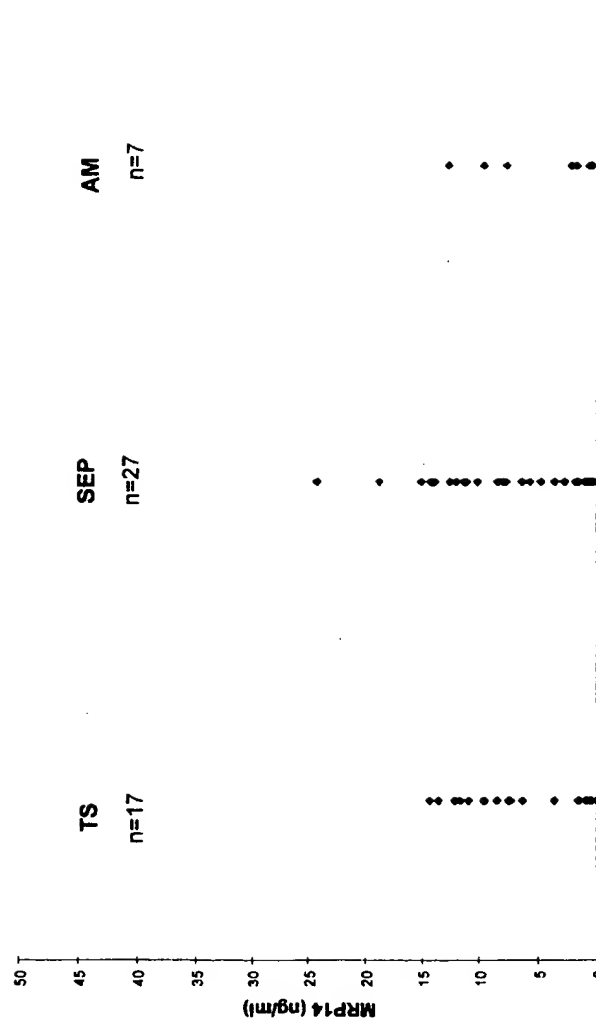


FIG. 4

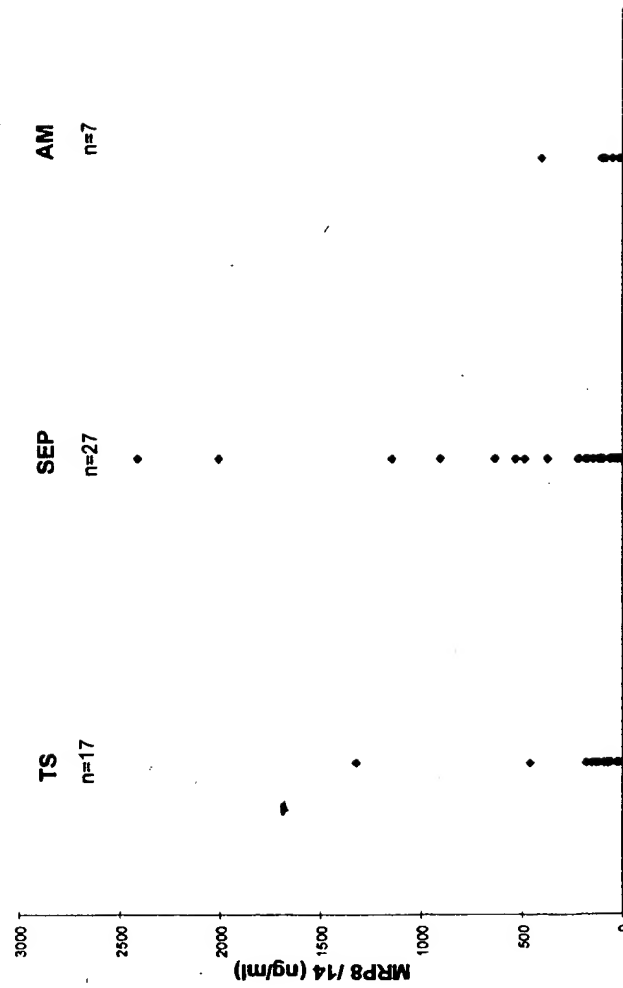
5/18

Dosage MRP14

FIG. 5

6/18

Dosage MRP8/14

FIG. 6

7/18

Taux urinaire moyen par catégorie de population

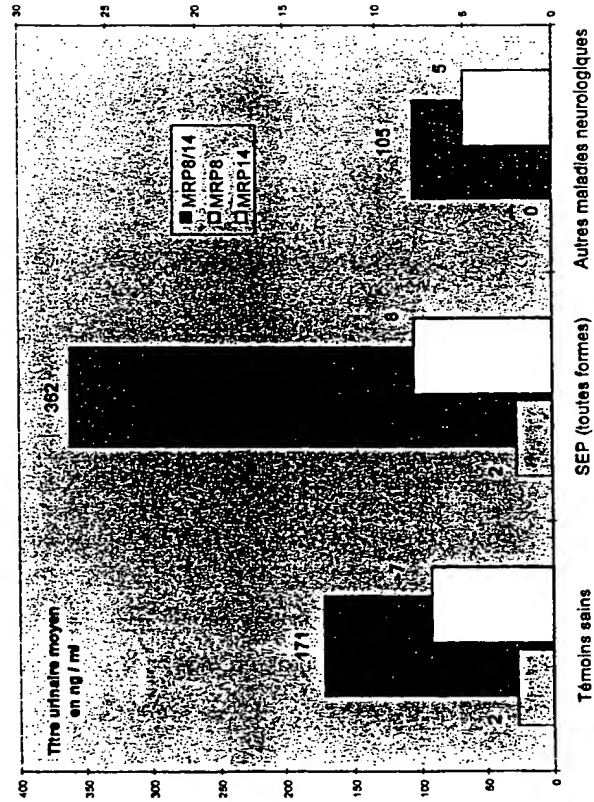
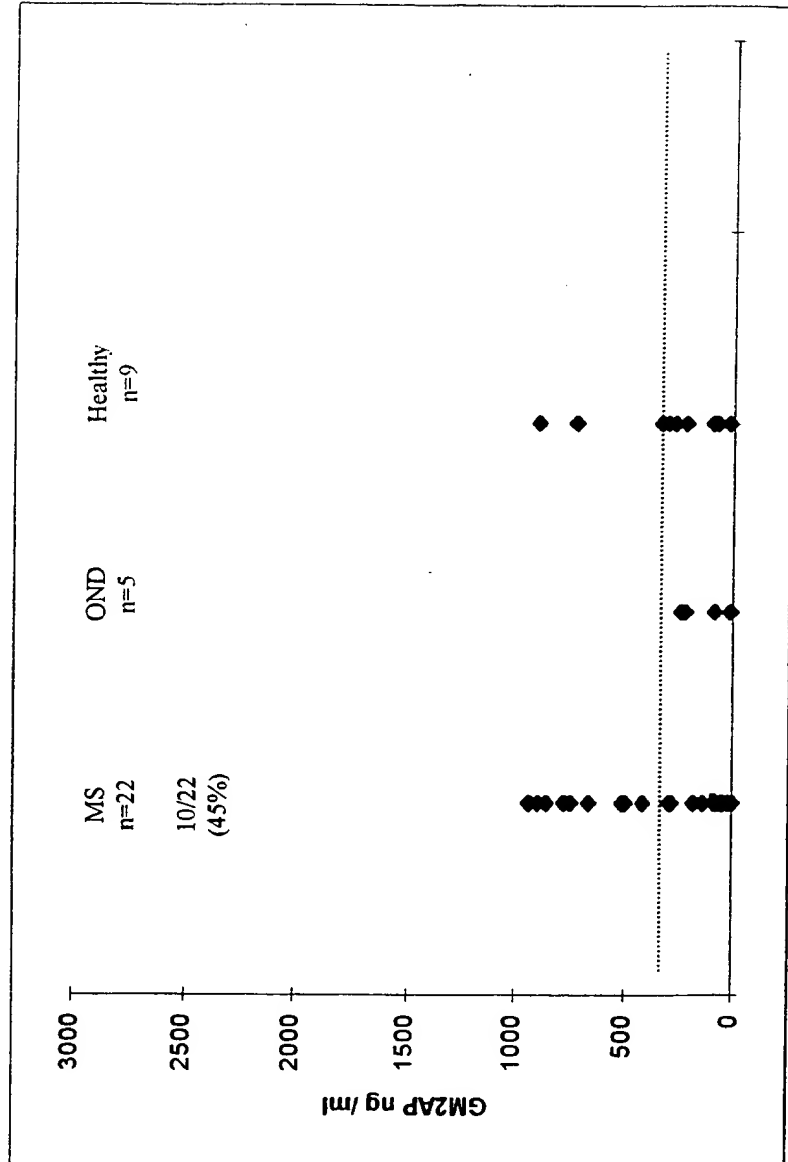


FIG. 7

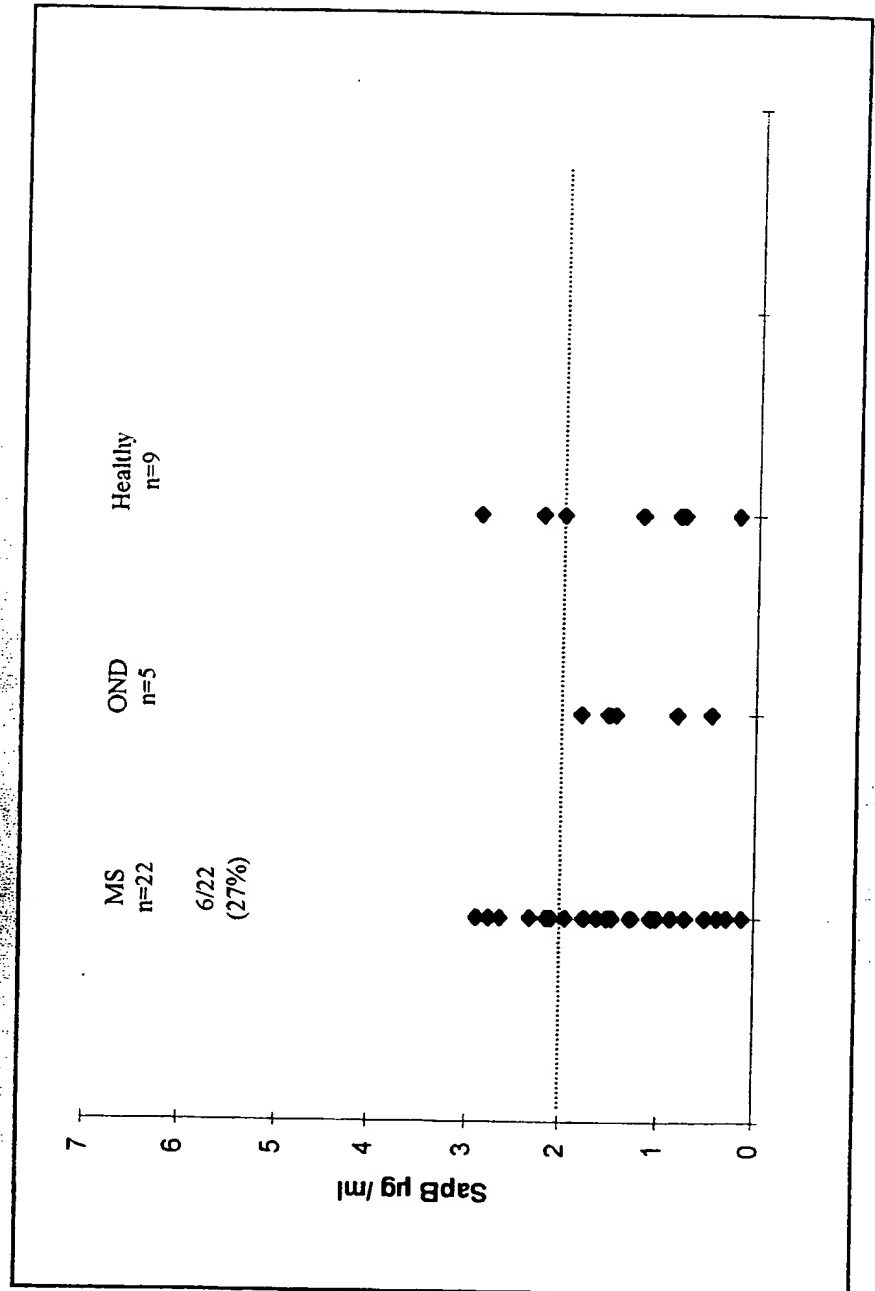
8/18

Figure 8



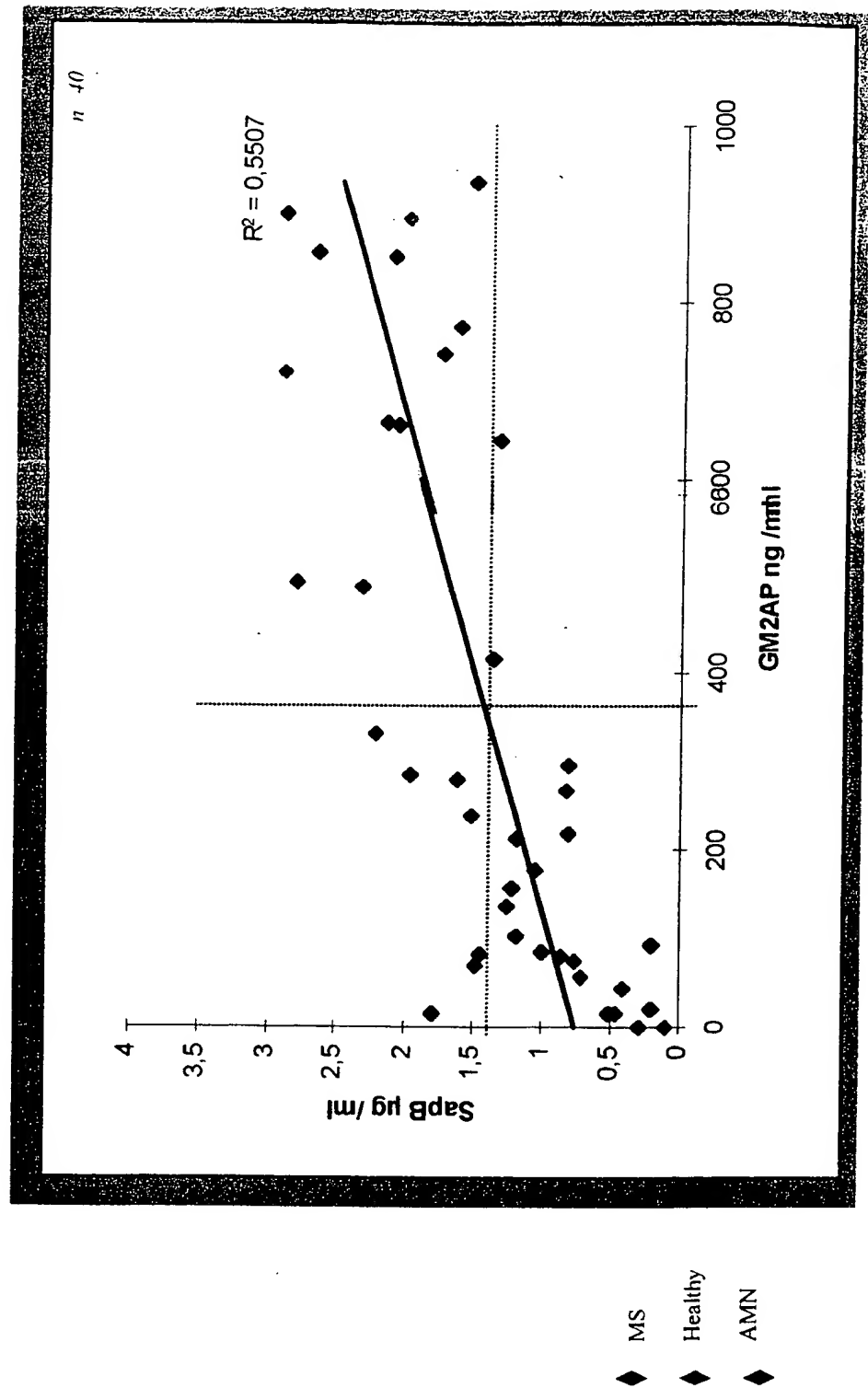
9/18

Figure 9



10/18

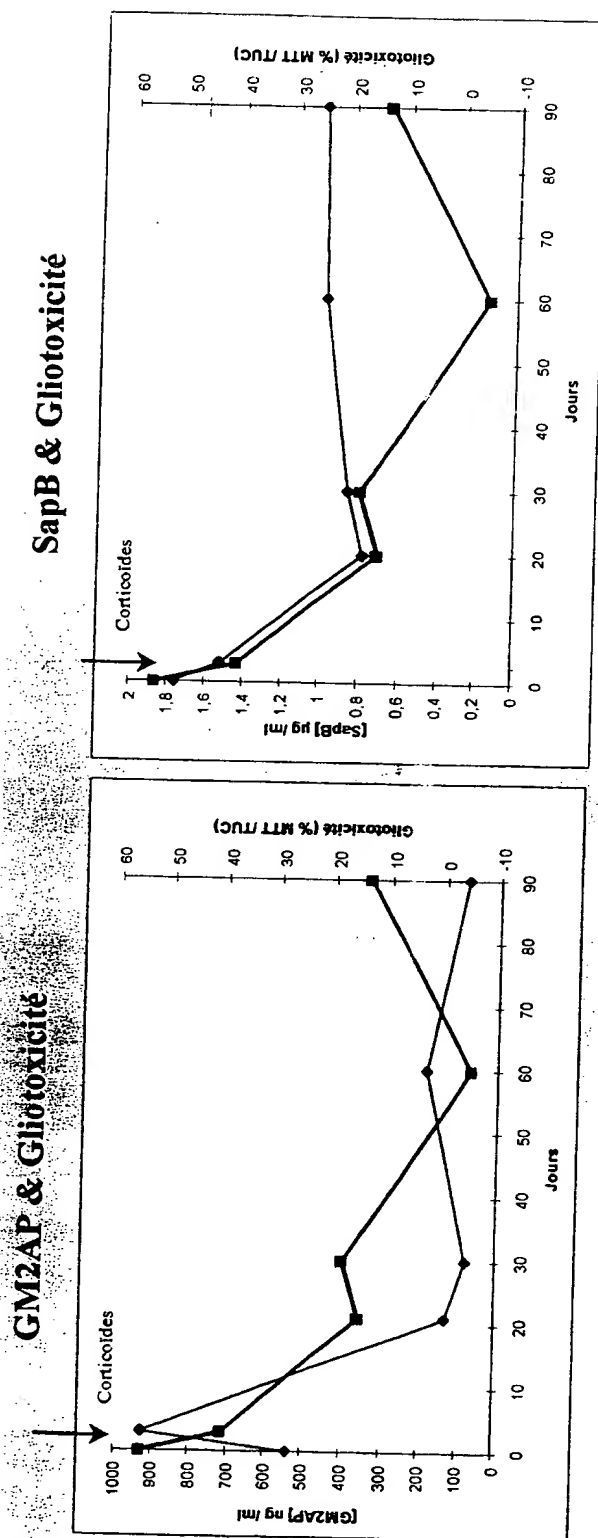
Figure 10



11/18

Figure 11

Patient SEP forme Rémittent Progressive



12/18

Figure 12

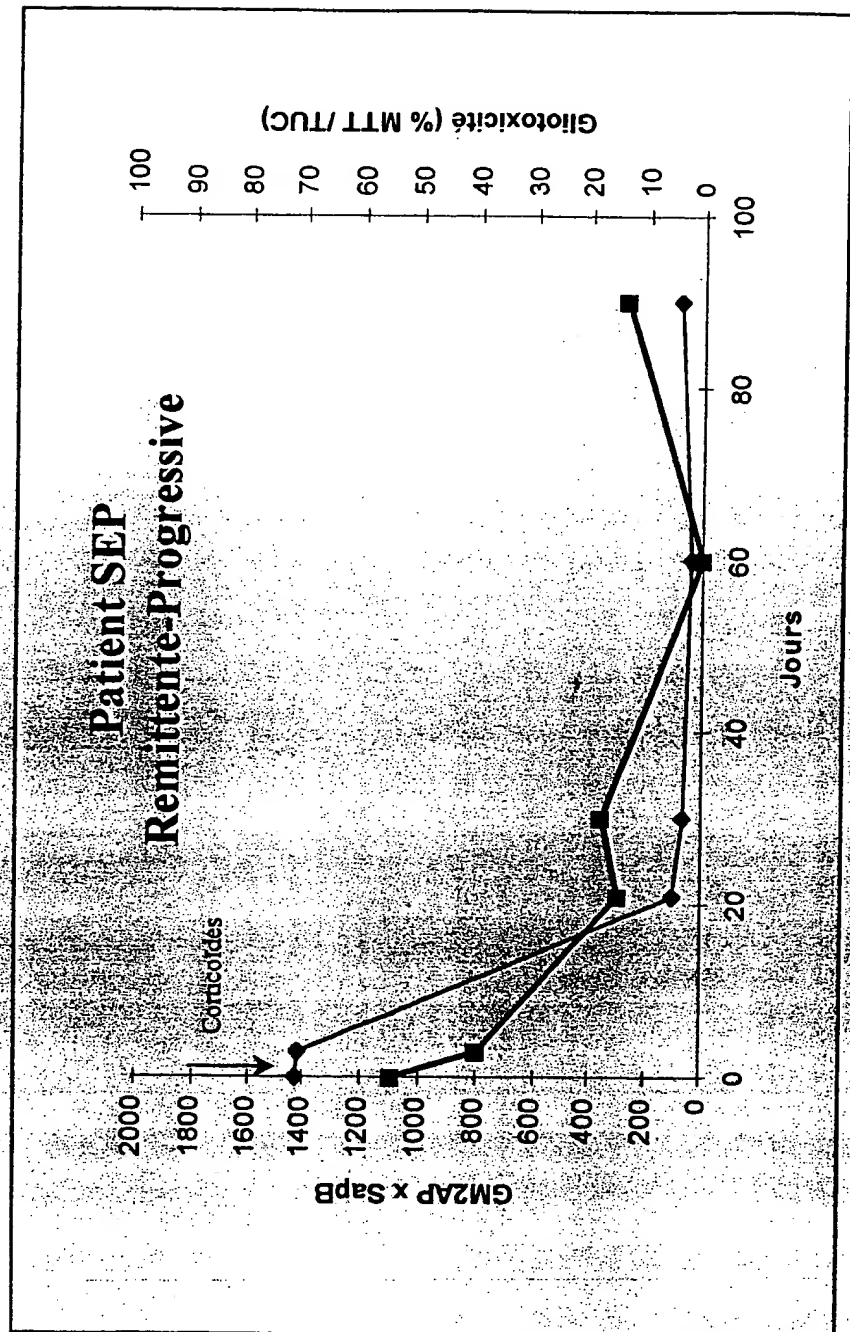
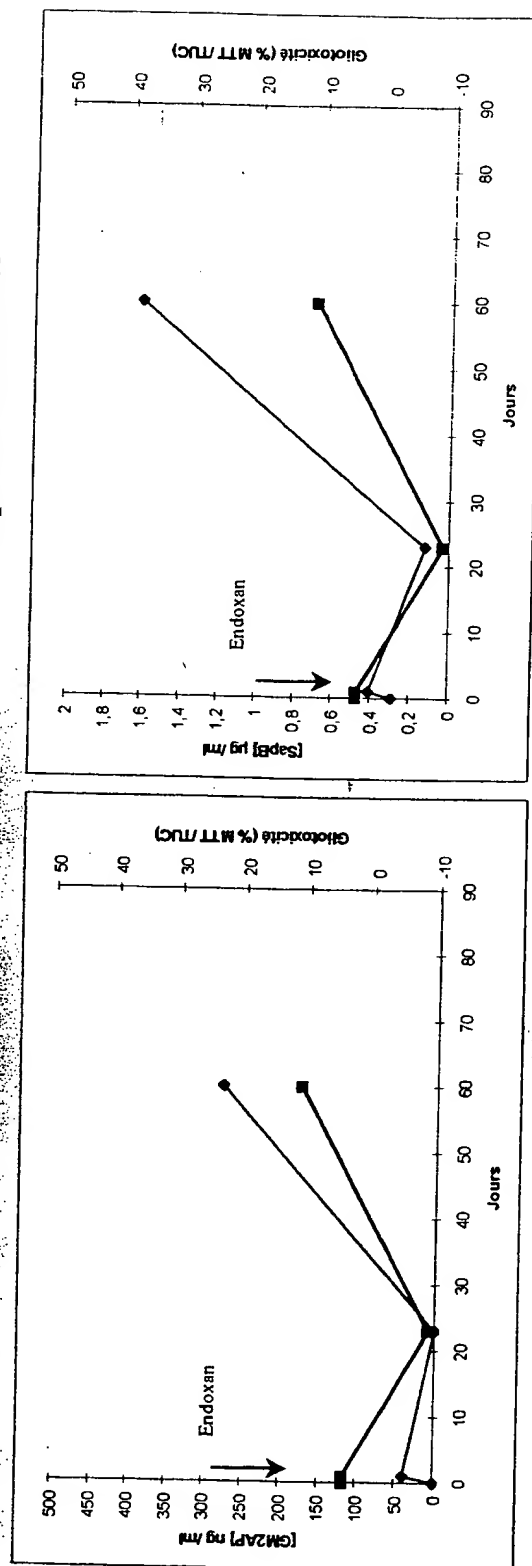


Figure 13

Patient SEP - Progressive

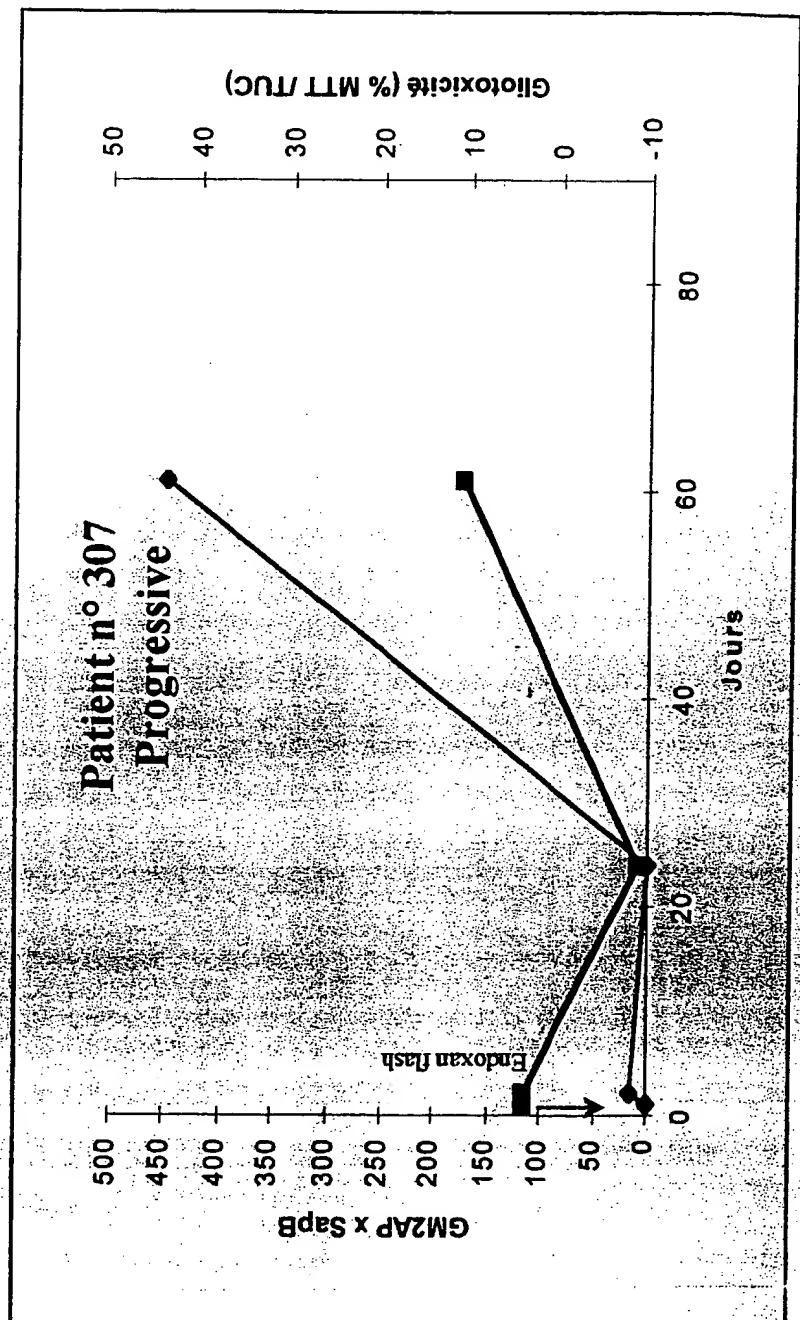
GM2AP & Gliotoxici 

SapB & Gliotoxici 



14/18

Figure 14



15/18

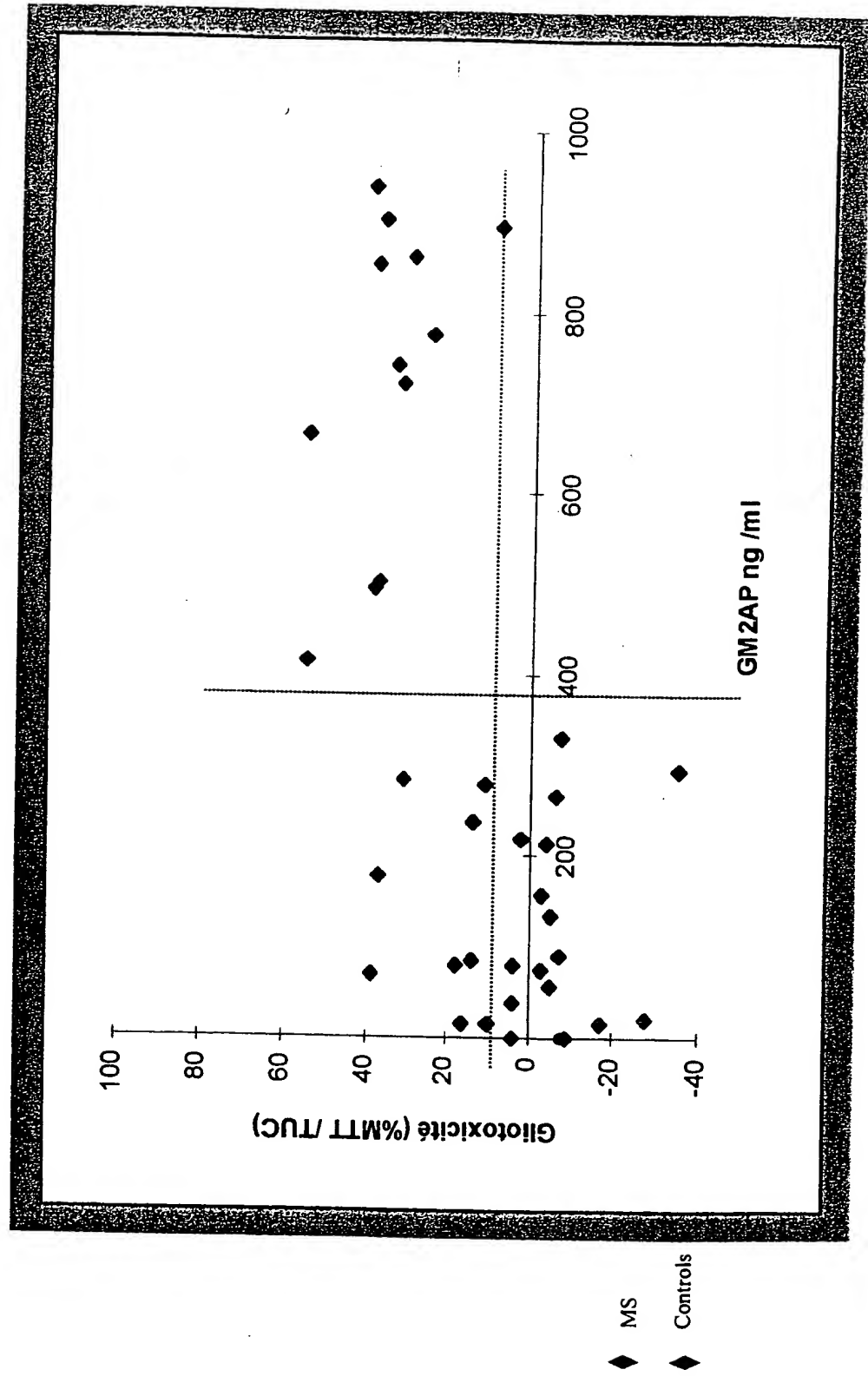
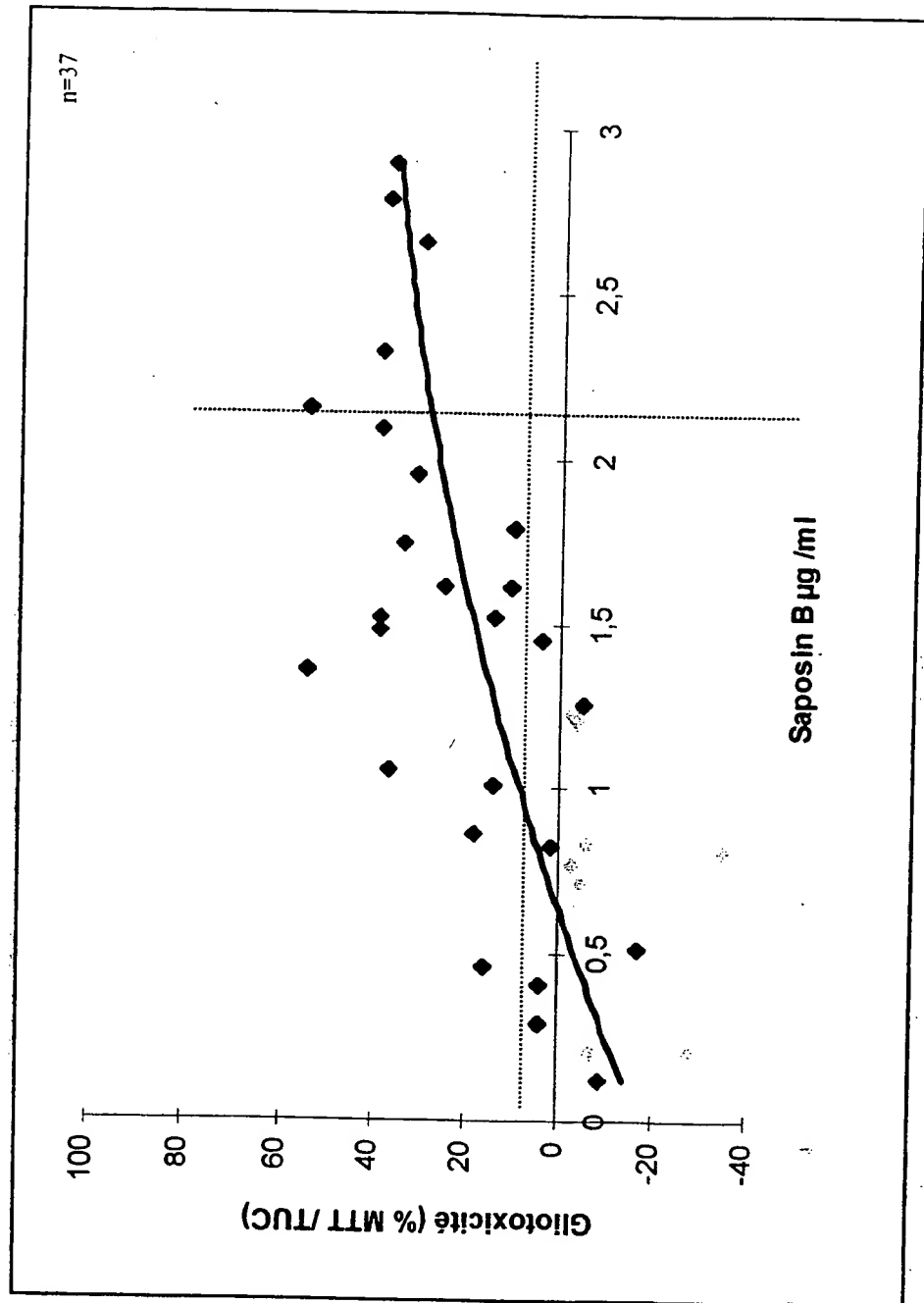
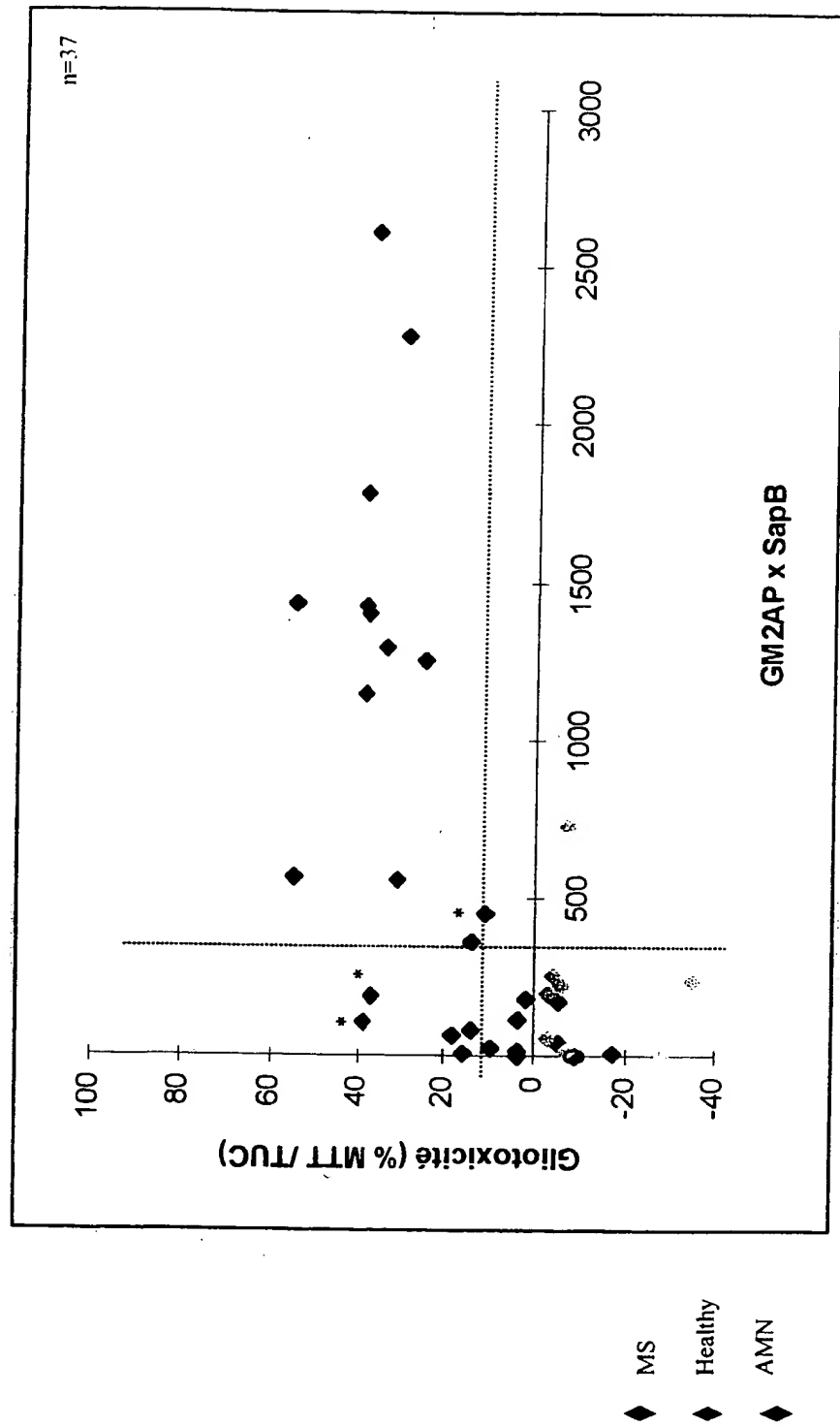
Figure 15

Figure 16



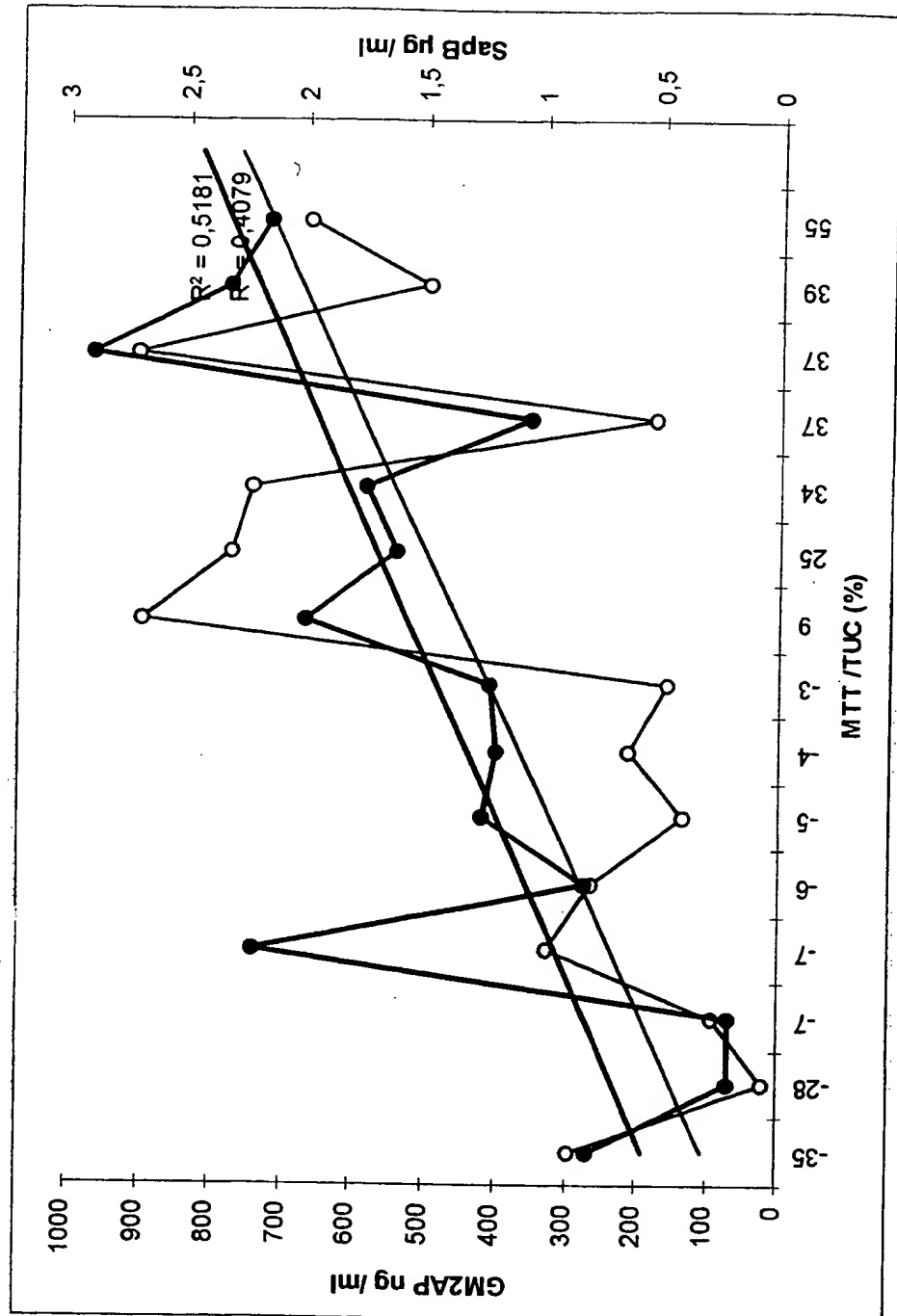
17/18

Figure 17



18/18

Figure 18



LISTE DE SEQUENCES

<110> BIOMERIEUX STELHYS

5 <120> Utilisation d'un polypeptide pour détecter, prévenir ou
traiter un état pathologique associé à une maladie
dégénérative, neurologique ou auto-immune

<130> SEP22

10

<140>

<141>

<150> FR9909372

15

<151> 1999-07-15

<160> 75

<170> PatentIn Ver. 2.1

20

<210> 1

<211> 4393

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25

<400> 1

Met Gly Trp Arg Ala Pro Gly Ala Leu Leu Leu Ala Leu Leu His
1 5 10 15

30 Gly Arg Leu Leu Ala Val Thr His Gly Leu Arg Ala Tyr Asp Gly Leu
20 25 30

Ser Leu Pro Glu Asp Ile Glu Thr Val Thr Ala Ser Gln Met Arg Trp
35 40 45

35

Thr His Ser Tyr Leu Ser Asp Asp Glu Asp Met Leu Ala Asp Ser Ile
50 55 60

40 Ser Gly Asp Asp Leu Gly Ser Gly Asp Leu Gly Ser Gly Asp Phe Gln
65 70 75 80

Met Val Tyr Phe Arg Ala Leu Val Asn Phe Thr Arg Ser Ile Glu Tyr
85 90 95

45 Ser Pro Gln Leu Glu Asp Ala Gly Ser Arg Glu Phe Arg Glu Val Ser
100 105 110

Glu Ala Val Val Asp Thr Leu Glu Ser Glu Tyr Leu Lys Ile Pro Gly
115 120 125

50

Asp Gln Val Val Ser Val Val Phe Ile Lys Glu Leu Asp Gly Trp Val
130 135 140

55 Phe Val Glu Leu Asp Val Gly Ser Glu Gly Asn Ala Asp Gly Ala Gln
145 150 155 160

Ile Gln Glu Met Leu Leu Arg Val Ile Ser Ser Gly Ser Val Ala Ser
165 170 175

Tyr Val Thr Ser Pro Gln Gly Phe Gln Phe Arg Arg Leu Gly Thr Val
 180 185 190

5 Pro Gln Phe Pro Arg Ala Cys Thr Glu Ala Glu Phe Ala Cys His Ser
 195 200 205

Tyr Asn Glu Cys Val Ala Leu Glu Tyr Arg Cys Asp Arg Arg Pro Asp
 210 215 220

10 Cys Arg Asp Met Ser Asp Glu Leu Asn Cys Glu Glu Pro Val Leu Gly
 225 230 235 240

Ile Ser Pro Thr Phe Ser Leu Leu Val Glu Thr Thr Ser Leu Pro Pro
 15 245 250 255

Arg Pro Glu Thr Thr Ile Met Arg Gln Pro Pro Val Thr His Ala Pro
 260 265 270

20 Gln Pro Leu Leu Pro Gly Ser Val Arg Pro Leu Pro Cys Gly Pro Gln
 275 280 285

Glu Ala Ala Cys Arg Asn Gly His Cys Ile Pro Arg Asp Tyr Leu Cys
 290 295 300

25 Asp Gly Gln Glu Asp Cys Glu Asp Gly Ser Asp Glu Leu Asp Cys Gly
 305 310 315 320

Pro Pro Pro Pro Cys Glu Pro Asn Glu Phe Pro Cys Gly Asn Gly His
 30 325 330 335

Cys Ala Leu Lys Leu Trp Arg Cys Asp Gly Asp Phe Asp Cys Glu Asp
 340 345 350

35 Arg Thr Asp Glu Ala Asn Cys Pro Thr Lys Arg Pro Glu Glu Val Cys
 355 360 365

Gly Pro Thr Gln Phe Arg Cys Val Ser Thr Asn Met Cys Ile Pro Ala
 370 375 380

40 Ser Phe His Cys Asp Glu Glu Ser Asp Cys Pro Asp Arg Ser Asp Glu
 385 390 395 400

Phe Gly Cys Met Pro Pro Gln Val Val Thr Pro Pro Arg Glu Ser Ile
 45 405 410 415

Gln Ala Ser Arg Gly Gln Thr Val Thr Phe Thr Cys Val Ala Ile Gly
 420 425 430

50 Val Pro Ala Pro Phe Leu Ile Asn Trp Arg Leu Asn Trp Gly His Ile
 435 440 445

Pro Ser Gln Pro Arg Val Thr Val Thr Ser Glu Gly Gly Arg Gly Thr
 450 455 460

55 Leu Ile Ile Arg Asp Val Lys Glu Ser Asp Gln Gly Ala Tyr Thr Cys
 465 470 475 480

Glu Ala Met Asn Ala Arg Gly Met Val Phe Gly Ile Pro Asp Gly Val
 485 490 495
 5 Leu Glu Leu Val Pro Gln Arg Ala Gly Pro Cys Pro Asp Gly His Phe
 500 505 510
 Tyr Leu Glu His Ser Ala Ala Cys Leu Pro Cys Phe Cys Phe Gly Ile
 515 520 525
 10 Thr Ser Val Cys Gln Ser Thr Arg Arg Phe Arg Asp Gln Ile Arg Leu
 530 535 540
 Arg Phe Asp Gln Pro Asp Asp Phe Lys Gly Val Asn Val Thr Met Pro
 545 550 555 560
 15 Ala Gln Pro Gly Thr Pro Pro Leu Ser Ser Thr Gln Leu Gln Ile Asp
 565 570 575
 Pro Ser Leu His Glu Phe Gln Leu Val Asp Leu Ser Arg Arg Phe Leu
 580 585 590
 Val His Asp Ser Phe Trp Ala Leu Pro Glu Gln Phe Leu Gly Asn Lys
 595 600 605
 25 Val Asp Ser Tyr Gly Gly Ser Leu Arg Tyr Asn Val Arg Tyr Glu Leu
 610 615 620
 Ala Arg Gly Met Leu Glu Pro Val Gln Arg Pro Asp Val Val Leu Val
 625 630 635 640
 30 Gly Ala Gly Tyr Arg Leu Leu Ser Arg Gly His Thr Pro Thr Gln Pro
 645 650 655
 Gly Ala Leu Asn Gln Arg Gln Val Gln Phe Ser Glu Glu His Trp Val
 660 665 670
 His Glu Ser Gly Arg Pro Val Gln Arg Ala Glu Leu Leu Gln Val Leu
 675 680 685
 40 Gln Ser Leu Glu Ala Val Leu Ile Gln Thr Val Tyr Asn Thr Lys Met
 690 695 700
 Ala Ser Val Gly Leu Ser Asp Ile Ala Met Asp Thr Thr Val Thr His
 705 710 715 720
 45 Ala Thr Ser His Gly Arg Ala His Ser Val Glu Glu Cys Arg Cys Pro
 725 730 735
 Ile Gly Tyr Ser Gly Leu Ser Cys Glu Ser Cys Asp Ala His Phe Thr
 740 745 750
 Arg Val Pro Gly Gly Pro Tyr Leu Gly Thr Cys Ser Gly Cys Ser Cys
 755 760 765
 55 Asn Gly His Ala Ser Ser Cys Asp Pro Val Tyr Gly His Cys Leu Asn
 770 775 780
 Cys Gln His Asn Thr Glu Gly Pro Gln Cys Lys Lys Cys Lys Ala Gly

785 790 795 800
 Phe Phe Gly Asp Ala Met Lys Ala Thr Ala Thr Ser Cys Arg Pro Cys
 805 810 815
 5 Pro Cys Pro Tyr Ile Asp Ala Ser Arg Arg Phe Ser Asp Thr Cys Phe
 820 825 830
 10 Leu Asp Thr Asp Gly Gln Ala Thr Cys Asp Ala Cys Ala Pro Gly Tyr
 835 840 845
 Thr Gly Arg Arg Cys Glu Ser Cys Ala Pro Gly Tyr Glu Gly Asn Pro
 850 855 860
 15 Ile Gln Pro Gly Gly Lys Cys Arg Pro Val Asn Gln Glu Ile Val Arg
 865 870 875 880
 Cys Asp Glu Arg Gly Ser Met Gly Thr Ser Gly Glu Ala Cys Arg Cys
 885 890 895
 20 Lys Asn Asn Val Val Gly Arg Leu Cys Asn Glu Cys Ala Asp Arg Ser
 900 905 910
 25 Phe His Leu Ser Thr Arg Asn Pro Asp Gly Cys Leu Lys Cys Phe Cys
 915 920 925
 Met Gly Val Ser Arg His Cys Thr Ser Ser Ser Trp Ser Arg Ala Gln
 930 935 940
 30 Leu His Gly Ala Ser Glu Glu Pro Gly His Phe Ser Leu Thr Asn Ala
 945 950 955 960
 Ala Ser Thr His Thr Thr Asn Glu Gly Ile Phe Ser Pro Thr Pro Gly
 965 970 975
 35 Glu Leu Gly Phe Ser Ser Phe His Arg Leu Leu Ser Gly Pro Tyr Phe
 980 985 990
 40 Trp Ser Leu Pro Ser Arg Phe Leu Gly Asp Lys Val Thr Ser Tyr Gly
 995 1000 1005
 Gly Glu Leu Arg Phe Thr Val Thr Gln Arg Ser Gln Pro Gly Ser Thr
 1010 1015 1020
 45 Pro Leu His Gly Gln Pro Leu Val Val Leu Gln Gly Asn Asn Ile Ile
 1025 1030 1035 1040
 Leu Glu His His Val Ala Gln Glu Pro Ser Pro Gly Gln Pro Ser Thr
 1045 1050 1055
 50 Phe Ile Val Pro Phe Arg Glu Gln Ala Trp Gln Arg Pro Asp Gly Gln
 1060 1065 1070
 55 Pro Ala Thr Arg Glu His Leu Leu Met Ala Leu Ala Gly Ile Asp Thr
 1075 1080 1085
 Leu Leu Ile Arg Ala Ser Tyr Ala Gln Gln Pro Ala Glu Ser Arg Val
 1090 1095 1100

Ser Gly Ile Ser Met Asp Val Ala Val Pro Glu Glu Thr Gly Gln Asp
 1105 1110 1115 1120

5 Pro Ala Leu Glu Val Glu Gln Cys Ser Cys Pro Pro Gly Tyr Arg Gly
 1125 1130 1135

Pro Ser Cys Gln Asp Cys Asp Thr Gly Tyr Thr Arg Thr Pro Ser Gly
 1140 1145 1150

10 Leu Tyr Leu Gly Thr Cys Glu Arg Cys Ser Cys His Gly His Ser Glu
 1155 1160 1165

15 Ala Cys Glu Pro Glu Thr Gly Ala Cys Gln Gly Cys Gln His His Thr
 1170 1175 1180

Glu Gly Pro Arg Cys Glu Gln Cys Gln Pro Gly Tyr Tyr Gly Asp Ala
 1185 1190 1195 1200

20 Gln Arg Gly Thr Pro Gln Asp Cys Gln Leu Cys Pro Cys Tyr Gly Asp
 1205 1210 1215

Pro Ala Ala Gly Gln Ala Ala His Thr Cys Phe Leu Asp Thr Asp Gly
 1220 1225 1230

25 His Pro Thr Cys Asp Ala Cys Ser Pro Gly His Ser Gly Arg His Cys
 1235 1240 1245

30 Glu Arg Cys Ala Pro Gly Tyr Tyr Gly Asn Pro Ser Gln Gly Gln Pro
 1250 1255 1260

Cys Gln Arg Asp Ser Gln Val Pro Gly Pro Ile Gly Cys Asn Cys Asp
 1265 1270 1275 1280

35 Pro Gln Gly Ser Val Ser Ser Gln Cys Asp Ala Ala Gly Gln Cys Gln
 1285 1290 1295

Cys Lys Ala Gln Val Glu Gly Leu Thr Cys Ser His Cys Arg Pro His
 1300 1305 1310

40 His Phe His Leu Ser Ala Ser Asn Pro Asp Gly Cys Leu Pro Cys Phe
 1315 1320 1325

Cys Met Gly Ile Thr Gln Gln Cys Ala Ser Ser Ala Tyr Thr Arg His
 1330 1335 1340

45 Leu Ile Ser Thr His Phe Ala Pro Gly Asp Phe Gln Gly Phe Ala Leu
 1345 1350 1355 1360

50 Val Asn Pro Gln Arg Asn Ser Arg Leu Thr Gly Glu Phe Thr Val Glu
 1365 1370 1375

Pro Val Pro Glu Gly Ala Gln Leu Ser Phe Gly Asn Phe Ala Gln Leu
 1380 1385 1390

55 Gly His Glu Ser Phe Tyr Trp Gln Leu Pro Glu Thr Tyr Gln Gly Asp
 1395 1400 1405

Lys Val Ala Ala Tyr Gly Gly Lys Leu Arg Tyr Thr Leu Ser Tyr Thr
 1410 1415 1420
 Ala Gly Pro Gln Gly Ser Pro Leu Ser Asp Pro Asp Val Gln Ile Thr
 5 1425 1430 1435 1440
 Gly Asn Asn Ile Met Leu Val Ala Ser Gln Pro Ala Leu Gln Gly Pro
 1445 1450 1455
 10 Glu Arg Arg Ser Tyr Glu Ile Met Phe Arg Glu Glu Phe Trp Arg Arg
 1460 1465 1470
 Pro Asp Gly Gln Pro Ala Thr Arg Glu His Leu Leu Met Ala Leu Ala
 1475 1480 1485
 15 Asp Leu Asp Glu Leu Leu Ile Arg Ala Thr Phe Ser Ser Val Pro Leu
 1490 1495 1500
 Val Ala Ser Ile Ser Ala Val Ser Leu Glu Val Ala Gln Pro Gly Pro
 20 1505 1510 1515 1520
 Ser Asn Arg Pro Arg Ala Leu Glu Val Glu Glu Cys Arg Cys Pro Pro
 1525 1530 1535
 25 Gly Tyr Ile Gly Leu Ser Cys Gln Asp Cys Ala Pro Gly Tyr Thr Arg
 1540 1545 1550
 Thr Gly Ser Gly Leu Tyr Leu Gly His Cys Glu Leu Cys Glu Cys Asn
 1555 1560 1565
 30 Gly His Ser Asp Leu Cys His Pro Glu Thr Gly Ala Cys Ser Gln Cys
 1570 1575 1580
 Gln His Asn Ala Ala Gly Glu Phe Cys Glu Leu Cys Ala Pro Gly Tyr
 35 1585 1590 1595 1600
 Tyr Gly Asp Ala Thr Ala Gly Thr Pro Glu Asp Cys Gln Pro Cys Ala
 1605 1610 1615
 40 Cys Pro Leu Thr Asn Pro Glu Asn Met Phe Ser Arg Thr Cys Glu Ser
 1620 1625 1630
 Leu Gly Ala Gly Gly Tyr Arg Cys Thr Ala Cys Glu Pro Gly Tyr Thr
 1635 1640 1645
 45 Gly Gln Tyr Cys Glu Gln Cys Gly Pro Gly Tyr Val Gly Asn Pro Ser
 1650 1655 1660
 Val Gln Gly Gly Gln Cys Leu Pro Glu Thr Asn Gln Ala Pro Leu Val
 50 1665 1670 1675 1680
 Val Glu Val His Pro Ala Arg Ser Ile Val Pro Gln Gly Gly Ser His
 1685 1690 1695
 55 Ser Leu Arg Cys Gln Val Ser Gly Arg Gly Pro His Tyr Phe Tyr Trp
 1700 1705 1710
 Ser Arg Glu Asp Gly Arg Pro Val Pro Ser Gly Thr Gln Gln Arg His

	1715	1720	1725
	Gln Gly Ser Glu Leu His Phe Pro Ser Val Gln Pro Ser Asp Ala Gly		
	1730	1735	1740
5	Val Tyr Ile Cys Thr Cys Arg Asn Leu His Arg Ser Asn Thr Ser Arg		
	1745	1750	1755 1760
	Ala Glu Leu Leu Val Thr Glu Ala Pro Ser Lys Pro Ile Thr Val Thr		
10		1765	1770 1775
	Val Glu Glu Gln Arg Ser Gln Ser Val Arg Pro Gly Ala Asp Val Thr		
	1780	1785	1790
15	Phe Ile Cys Thr Ala Lys Ser Lys Ser Pro Ala Tyr Thr Leu Val Trp		
	1795	1800	1805
	Thr Arg Leu His Asn Gly Lys Leu Pro Thr Arg Ala Met Asp Phe Asn		
20		1810 1815	1820
	Gly Ile Leu Thr Ile Arg Asn Val Gln Leu Ser Asp Ala Gly Thr Tyr		
	1825	1830	1835 1840
	Val Cys Thr Gly Ser Asn Met Phe Ala Met Asp Gln Gly Thr Ala Thr		
25		1845	1850 1855
	Leu His Val Gln Ala Ser Gly Thr Leu Ser Ala Pro Val Val Ser Ile		
	1860	1865	1870
30	His Pro Pro Gln Leu Thr Val Gln Pro Gly Gln Leu Ala Glu Phe Arg		
	1875	1880	1885
	Cys Ser Ala Thr Gly Ser Pro Thr Pro Thr Leu Glu Trp Thr Gly Gly		
35		1890 1895	1900
	Pro Gly Gly Gln Leu Pro Ala Lys Ala Gln Ile His Gly Gly Ile Leu		
	1905	1910	1915 1920
	Arg Leu Pro Ala Val Glu Pro Thr Asp Gln Ala Gln Tyr Leu Cys Arg		
40		1925	1930 1935
	Ala His Ser Ser Ala Gly Gln Gln Val Ala Arg Ala Val Leu His Val		
	1940	1945	1950
45	His Gly Gly Gly Gly Pro Arg Val Gln Val Ser Pro Glu Arg Thr Gln		
	1955	1960	1965
	Val His Ala Gly Arg Thr Val Arg Leu Tyr Cys Arg Ala Ala Gly Val		
50		1970 1975	1980
	Pro Ser Ala Thr Ile Thr Trp Arg Lys Glu Gly Gly Ser Leu Pro Pro		
	1985	1990	1995 2000
	Gln Ala Arg Ser Glu Arg Thr Asp Ile Ala Thr Leu Leu Ile Pro Ala		
55		2005	2010 2015
	Ile Thr Thr Ala Asp Ala Gly Phe Tyr Leu Cys Val Ala Thr Ser Pro		
	2020	2025	2030

Ala Gly Thr Ala Gln Ala Arg Ile Gln Val Val Val Leu Ser Ala Ser
2035 2040 2045

5 Asp Ala Ser Gln Pro Pro Val Lys Ile Glu Ser Ser Ser Pro Ser Val
2050 2055 2060

Thr Glu Gly Gln Thr Leu Asp Leu Asn Cys Val Val Ala Gly Ser Ala
2065 2070 2075 2080

10 His Ala Gln Val Thr Trp Tyr Arg Arg Gly Gly Ser Leu Pro His His
2085 2090 2095

Thr Gln Val His Gly Ser Arg Leu Arg Leu Pro Gln Val Ser Pro Ala
15 2100 2105 2110

Asp Ser Gly Glu Tyr Val Cys Arg Val Glu Asn Gly Ser Gly Pro Lys
2115 2120 2125

20 Glu Ala Ser Ile Thr Val Ser Val Leu His Gly Thr His Ser Gly Pro
2130 2135 2140

Ser Tyr Thr Pro Val Pro Gly Ser Thr Arg Pro Ile Arg Ile Glu Pro
2145 2150 2155 2160

25 Ser Ser Ser His Val Ala Glu Gly Gln Thr Leu Asp Leu Asn Cys Val
2165 2170 2175

Val Pro Gly Gln Ala His Ala Gln Val Thr Trp His Lys Arg Gly Gly
30 2180 2185 2190

Ser Leu Pro Ala Arg His Gln Thr His Gly Ser Leu Leu Arg Leu His
2195 2200 2205

35 Gln Val Thr Pro Ala Asp Ser Gly Glu Tyr Val Cys His Val Val Gly
2210 2215 2220

Thr Ser Gly Pro Leu Glu Ala Ser Val Leu Val Thr Ile Glu Ala Ser
2225 2230 2235 2240

40 Val Ile Pro Gly Pro Ile Pro Pro Val Arg Ile Glu Ser Ser Ser Ser
2245 2250 2255

Thr Val Ala Glu Gly Gln Thr Leu Asp Leu Ser Cys Val Val Ala Gly
45 2260 2265 2270

Gln Ala His Ala Gln Val Thr Trp Tyr Lys Arg Gly Gly Ser Leu Pro
2275 2280 2285

50 Ala Arg His Gln Val Arg Gly Ser Arg Leu Tyr Ile Phe Gln Ala Ser
2290 2295 2300

Pro Ala Asp Ala Gly Gln Tyr Val Cys Arg Ala Ser Asn Gly Met Glu
2305 2310 2315 2320

55 Ala Ser Ile Thr Val Thr Val Thr Gly Thr Gln Gly Ala Asn Leu Ala
2325 2330 2335

Tyr Pro Ala Gly Ser Thr Gln Pro Ile Arg Ile Glu Pro Ser Ser Ser
 2340 2345 2350
 5 Gln Val Ala Glu Gly Gln Thr Leu Asp Leu Asn Cys Val Val Pro Gly
 2355 2360 2365
 Gln Ser His Ala Gln Val Thr Trp His Lys Arg Gly Gly Ser Leu Pro
 2370 2375 2380
 10 Val Arg His Gln Thr His Gly Ser Leu Leu Arg Leu Tyr Gln Ala Ser
 2385 2390 2395 2400
 Pro Ala Asp Ser Gly Glu Tyr Val Cys Arg Val Leu Gly Ser Ser Val
 2405 2410 2415
 15 Pro Leu Glu Ala Ser Val Leu Val Thr Ile Glu Pro Ala Gly Ser Val
 2420 2425 2430
 Pro Ala Leu Gly Val Thr Pro Thr Val Arg Ile Glu Ser Ser Ser Ser
 2435 2440 2445
 Gln Val Ala Glu Gly Gln Thr Leu Asp Leu Asn Cys Leu Val Ala Gly
 2450 2455 2460
 25 Gln Ala His Ala Gln Val Thr Trp His Lys Arg Gly Gly Ser Leu Pro
 2465 2470 2475 2480
 Ala Arg His Gln Val His Gly Ser Arg Leu Arg Leu Leu Gln Val Thr
 2485 2490 2495
 30 Pro Ala Asp Ser Gly Glu Tyr Val Cys Arg Val Val Gly Ser Ser Gly
 2500 2505 2510
 Thr Gln Glu Ala Ser Val Leu Val Thr Ile Gln Gln Arg Leu Ser Gly
 2515 2520 2525
 35 Ser His Ser Gln Gly Val Ala Tyr Pro Val Arg Ile Glu Ser Ser Ser
 2530 2535 2540
 40 Ala Ser Leu Ala Asn Gly His Thr Leu Asp Leu Asn Cys Leu Val Ala
 2545 2550 2555 2560
 Ser Gln Ala Pro His Thr Ile Thr Trp Tyr Lys Arg Gly Gly Ser Leu
 2565 2570 2575
 45 Pro Ser Arg His Gln Ile Val Gly Ser Arg Leu Arg Ile Pro Gln Val
 2580 2585 2590
 50 Thr Pro Ala Asp Ser Gly Glu Tyr Val Cys His Val Ser Asn Gly Ala
 2595 2600 2605
 Gly Ser Arg Glu Thr Ser Leu Ile Val Thr Ile Gln Gly Ser Gly Ser
 2610 2615 2620
 55 Ser His Val Pro Arg Val Ser Pro Pro Ile Arg Ile Glu Ser Ser Ser
 2625 2630 2635 2640
 Pro Thr Val Val Glu Gly Gln Thr Leu Asp Leu Asn Cys Val Val Ala

	2645	2650	2655
	Arg Gln Pro Gln Ala Ile Ile Thr Trp Tyr Lys Arg Gly Gly Ser Leu		
	2660	2665	2670
5	Pro Ser Arg His Gln Thr His Gly Ser His Leu Arg Leu His Gln Met		
	2675	2680	2685
10	Ser Val Ala Asp Ser Gly Glu Tyr Val Cys Arg Ala Asn Asn Ile		
	2690	2695	2700
	Asp Ala Leu Glu Ala Ser Ile Val Ile Ser Val Ser Pro Ser Ala Gly		
	2705	2710	2715
15	Ser Pro Ser Ala Pro Gly Ser Ser Met Pro Ile Arg Ile Glu Ser Ser		
	2725	2730	2735
	Ser Ser His Val Ala Glu Gly Glu Thr Leu Asp Leu Asn Cys Val Val		
	2740	2745	2750
20	Pro Gly Gln Ala His Ala Gln Val Thr Trp His Lys Arg Gly Gly Ser		
	2755	2760	2765
	Leu Pro Ser Tyr His Gln Thr Arg Gly Ser Arg Leu Arg Leu His His		
25	2770	2775	2780
	Val Ser Pro Ala Asp Ser Gly Glu Tyr Val Cys Arg Val Met Gly Ser		
	2785	2790	2795
30	Ser Gly Pro Leu Glu Ala Ser Val Leu Val Thr Ile Glu Ala Ser Gly		
	2805	2810	2815
	Ser Ser Ala Val His Val Pro Ala Pro Gly Gly Ala Pro Pro Ile Arg		
	2820	2825	2830
35	Ile Glu Pro Ser Ser Ser Arg Val Ala Glu Gly Gln Thr Leu Asp Leu		
	2835	2840	2845
	Lys Cys Val Val Pro Gly Gln Ala His Ala Gln Val Thr Trp His Lys		
40	2850	2855	2860
	Arg Gly Gly Asn Leu Pro Ala Arg His Gln Val His Gly Pro Leu Leu		
	2865	2870	2875
45	Arg Leu Asn Gln Val Ser Pro Ala Asp Ser Gly Glu Tyr Ser Cys Gln		
	2885	2890	2895
	Val Thr Gly Ser Ser Gly Thr Leu Glu Ala Ser Val Leu Val Thr Ile		
	2900	2905	2910
50	Glu Pro Ser Ser Pro Gly Pro Ile Pro Ala Pro Gly Leu Ala Gln Pro		
	2915	2920	2925
	Ile Tyr Ile Glu Ala Ser Ser Ser His Val Thr Glu Gly Gln Thr Leu		
55	2930	2935	2940
	Asp Leu Asn Cys Val Val Pro Gly Gln Ala His Ala Gln Val Thr Trp		
	2945	2950	2955
			2960

Tyr Lys Arg Gly Gly Ser Leu Pro Ala Arg His Gln Thr His Gly Ser
 2965 2970 2975
 5 Gln Leu Arg Leu His His Val Ser Pro Ala Asp Ser Gly Glu Tyr Val
 2980 2985 2990
 Cys Arg Ala Ala Gly Gly Pro Gly Pro Glu Gln Glu Ala Ser Phe Thr
 2995 3000 3005
 10 Val Thr Val Pro Pro Ser Glu Gly Ser Ser Tyr Arg Leu Arg Ser Pro
 3010 3015 3020
 Val Ile Ser Ile Asp Pro Pro Ser Ser Thr Val Gln Gln Gly Gln Asp
 15 3025 3030 3035 3040
 Ala Ser Phe Lys Cys Leu Ile His Asp Gly Ala Ala Pro Ile Ser Leu
 3045 3050 3055
 20 Glu Trp Lys Thr Arg Asn Gln Glu Leu Glu Asp Asn Val His Ile Ser
 3060 3065 3070
 Pro Asn Gly Ser Ile Ile Thr Ile Val Gly Thr Arg Pro Ser Asn His
 3075 3080 3085
 25 Gly Thr Tyr Arg Cys Val Ala Ser Asn Ala Tyr Gly Val Ala Gln Ser
 3090 3095 3100
 Val Val Asn Leu Ser Val His Gly Pro Pro Thr Val Ser Val Leu Pro
 30 3105 3110 3115 3120
 Glu Gly Pro Val Trp Val Lys Val Gly Lys Ala Val Thr Leu Glu Cys
 3125 3130 3135
 35 Val Ser Ala Gly Glu Pro Arg Ser Ser Ala Arg Trp Thr Arg Ile Ser
 3140 3145 3150
 Ser Thr Pro Ala Lys Leu Glu Gln Arg Thr Tyr Gly Leu Met Asp Ser
 3155 3160 3165
 40 His Thr Val Leu Gln Ile Ser Ser Ala Lys Pro Ser Asp Ala Gly Thr
 3170 3175 3180
 Tyr Val Cys Leu Ala Gln Asn Ala Leu Gly Thr Ala Gln Lys Gln Val
 45 3185 3190 3195 3200
 Glu Val Ile Val Asp Thr Gly Ala Met Ala Pro Gly Ala Pro Gln Val
 3205 3210 3215
 50 Gln Ala Glu Glu Ala Glu Leu Thr Val Glu Ala Gly His Thr Ala Thr
 3220 3225 3230
 Leu Arg Cys Ser Ala Thr Gly Ser Pro Ala Arg Thr Ile His Trp Ser
 3235 3240 3245
 55 Lys Leu Arg Ser Pro Leu Pro Trp Gln His Arg Leu Glu Gly Asp Thr
 3250 3255 3260

Leu Ile Ile Pro Arg Val Ala Gln Gln Asp Ser Gly Gln Tyr Ile Cys
 3265 3270 3275 3280
 5 Asn Ala Thr Ser Pro Ala Gly His Ala Glu Ala Thr Ile Ile Leu His
 3285 3290 3295
 Val Glu Ser Pro Pro Tyr Ala Thr Thr Val Pro Glu His Ala Ser Val
 3300 3305 3310
 10 Gln Ala Gly Glu Thr Val Gln Leu Gln Cys Leu Ala His Gly Thr Pro
 3315 3320 3325
 Pro Leu Thr Phe Gln Trp Ser Arg Val Gly Ser Ser Leu Pro Gly Arg
 3330 3335 3340
 15 Ala Thr Ala Arg Asn Glu Leu Leu His Phe Glu Arg Ala Ala Pro Glu
 3345 3350 3355 3360
 20 Asp Ser Gly Arg Tyr Arg Cys Arg Val Thr Asn Lys Val Gly Ser Ala
 3365 3370 3375
 Glu Ala Phe Ala Gln Leu Leu Val Gln Gly Pro Pro Gly Ser Leu Pro
 3380 3385 3390
 25 Ala Thr Ser Ile Pro Ala Gly Ser Thr Pro Thr Val Gln Val Thr Pro
 3395 3400 3405
 Gln Leu Glu Thr Lys Ser Ile Gly Ala Ser Val Glu Phe His Cys Ala
 3410 3415 3420
 30 Val Pro Ser Asp Arg Gly Thr Gln Leu Arg Trp Phe Lys Glu Gly Gly
 3425 3430 3435 3440
 Gln Leu Pro Pro Gly His Ser Val Gln Asp Gly Val Leu Arg Ile Gln
 3445 3450 3455
 35 Asn Leu Asp Gln Ser Cys Gln Gly Thr Tyr Ile Cys Gln Ala His Gly
 3460 3465 3470
 40 Pro Trp Gly Lys Ala Gln Ala Ser Ala Gln Leu Val Ile Gln Ala Leu
 3475 3480 3485
 Pro Ser Val Leu Ile Asn Ile Arg Thr Ser Val Gln Thr Val Val Val
 3490 3495 3500
 45 Gly His Ala Val Glu Phe Glu Cys Leu Ala Leu Gly Asp Pro Lys Pro
 3505 3510 3515 3520
 50 Gln Val Thr Trp Ser Lys Val Gly Gly His Leu Arg Pro Gly Ile Val
 3525 3530 3535
 Gln Ser Gly Gly Val Val Arg Ile Ala His Val Glu Leu Ala Asp Ala
 3540 3545 3550
 55 Gly Gln Tyr Arg Cys Thr Ala Thr Asn Ala Ala Gly Thr Thr Gln Ser
 3555 3560 3565
 His Val Leu Leu Leu Val Gln Ala Leu Pro Gln Ile Ser Met Pro Gln

	3570	3575	3580
	Glu Val Arg Val Pro Ala Gly Ser Ala Ala Val Phe Pro Cys Ile Ala		
	3585	3590	3595 3600
5	Ser Gly Tyr Pro Thr Pro Asp Ile Ser Trp Ser Lys Leu Asp Gly Ser		
	3605	3610	3615
10	Leu Pro Pro Asp Ser Arg Leu Glu Asn Asn Met Leu Met Leu Pro Ser		
	3620	3625	3630
	Val Gln Pro Gln Asp Ala Gly Thr Tyr Val Cys Thr Ala Thr Asn Arg		
	3635	3640	3645
15	Gln Gly Lys Val Lys Ala Phe Ala His Leu Gln Val Pro Glu Arg Val		
	3650	3655	3660
	Val Pro Tyr Phe Thr Gln Thr Pro Tyr Ser Phe Leu Pro Leu Pro Thr		
	3665	3670	3675 3680
20	Ile Lys Asp Ala Tyr Arg Lys Phe Glu Ile Lys Ile Thr Phe Arg Pro		
	3685	3690	3695
25	Asp Ser Ala Asp Gly Met Leu Leu Tyr Asn Gly Gln Lys Arg Val Pro		
	3700	3705	3710
	Gly Ser Pro Thr Asn Leu Ala Asn Arg Gln Pro Asp Phe Ile Ser Phe		
	3715	3720	3725
30	Gly Leu Val Gly Gly Arg Pro Glu Phe Arg Phe Asp Ala Gly Ser Gly		
	3730	3735	3740
	Met Ala Thr Ile Arg His Pro Thr Pro Leu Ala Leu Gly His Phe His		
	3745	3750	3755 3760
35	Thr Val Thr Leu Leu Arg Ser Leu Thr Gln Gly Ser Leu Ile Val Gly		
	3765	3770	3775
40	Asp Leu Ala Pro Val Asn Gly Thr Ser Gln Gly Lys Phe Gln Gly Leu		
	3780	3785	3790
	Asp Leu Asn Glu Glu Leu Tyr Leu Gly Gly Tyr Pro Asp Tyr Gly Ala		
	3795	3800	3805
45	Ile Pro Lys Ala Gly Leu Ser Ser Gly Phe Ile Gly Cys Val Arg Glu		
	3810	3815	3820
	Leu Arg Ile Gln Gly Glu Glu Ile Val Phe His Asp Leu Asn Leu Thr		
	3825	3830	3835 3840
50	Ala His Gly Ile Ser His Cys Pro Thr Cys Arg Asp Arg Pro Cys Gln		
	3845	3850	3855
55	Asn Gly Gly Gln Cys His Asp Ser Glu Ser Ser Ser Tyr Val Cys Val		
	3860	3865	3870
	Cys Pro Ala Gly Phe Thr Gly Ser Arg Cys Glu His Ser Gln Ala Leu		
	3875	3880	3885

His Cys His Pro Glu Ala Cys Gly Pro Asp Ala Thr Cys Val Asn Arg
 3890 3895 3900

5 Pro Asp Gly Arg Gly Tyr Thr Cys Arg Cys His Leu Gly Arg Ser Gly
 3905 3910 3915 3920

Leu Arg Cys Glu Glu Gly Val Thr Val Thr Thr Pro Ser Leu Ser Gly
 3925 3930 3935

10 Ala Gly Ser Tyr Leu Ala Leu Pro Ala Leu Thr Asn Thr His His Glu
 3940 3945 3950

Leu Arg Leu Asp Val Glu Phe Lys Pro Leu Ala Pro Asp Gly Val Leu
 15 3955 3960 3965

Leu Phe Ser Gly Gly Lys Ser Gly Pro Val Glu Asp Phe Val Ser Leu
 3970 3975 3980

20 Ala Met Val Gly Gly His Leu Glu Phe Arg Tyr Glu Leu Gly Ser Gly
 3985 3990 3995 4000

Leu Ala Val Leu Arg Thr Ala Glu Pro Leu Ala Leu Gly Arg Trp His
 4005 4010 4015

25 Arg Val Ser Ala Glu Arg Leu Asn Lys Asp Gly Ser Leu Arg Val Asn
 4020 4025 4030

Gly Gly Arg Pro Val Leu Arg Ser Ser Pro Gly Lys Ser Gln Gly Leu
 30 4035 4040 4045

Asn Leu His Thr Leu Leu Tyr Leu Gly Gly Val Glu Pro Ser Val Pro
 4050 4055 4060

35 Leu Ser Pro Ala Thr Asn Met Ser Ala His Phe Arg Gly Cys Val Gly
 4065 4070 4075 4080

Glu Val Ser Val Asn Gly Lys Arg Leu Asp Leu Thr Tyr Ser Phe Leu
 4085 4090 4095

40 Gly Ser Gln Gly Ile Gly Gln Cys Tyr Asp Ser Ser Pro Cys Glu Arg
 4100 4105 4110

Gln Pro Cys Gln His Gly Ala Thr Cys Met Pro Ala Gly Glu Tyr Glu
 45 4115 4120 4125

Phe Gln Cys Leu Cys Arg Asp Gly Ile Lys Gly Asp Leu Cys Glu His
 4130 4135 4140

50 Glu Glu Asn Pro Cys Gln Leu Arg Glu Pro Cys Leu His Gly Gly Thr
 4145 4150 4155 4160

Cys Gln Gly Thr Arg Cys Leu Cys Leu Pro Gly Phe Ser Gly Pro Arg
 4165 4170 4175

55 Cys Gln Gln Gly Ser Gly His Gly Ile Ala Glu Ser Asp Trp His Leu
 4180 4185 4190

Glu Gly Ser Gly Gly Asn Asp Ala Pro Gly Gln Tyr Gly Ala Tyr Phe
 4195 4200 4205
 5 His Asp Asp Gly Phe Leu Ala Phe Pro Gly His Val Phe Ser Arg Ser
 4210 4215 4220
 Leu Pro Glu Val Pro Glu Thr Ile Glu Leu Glu Val Arg Thr Ser Thr
 4225 4230 4235 4240
 10 Ala Ser Gly Leu Leu Leu Trp Gln Gly Val Glu Val Gly Glu Ala Gly
 4245 4250 4255
 Gln Gly Lys Asp Phe Ile Ser Leu Gly Leu Gln Asp Gly His Leu Val
 4260 4265 4270
 15 Phe Arg Tyr Gln Leu Gly Ser Gly Glu Ala Arg Leu Val Ser Glu Asp
 4275 4280 4285
 Pro Ile Asn Asp Gly Glu Trp His Arg Val Thr Ala Leu Arg Glu Gly
 20 4290 4295 4300
 Arg Arg Gly Ser Ile Gln Val Asp Gly Glu Glu Leu Val Ser Gly Arg
 4305 4310 4315 4320
 25 Ser Pro Gly Pro Asn Val Ala Val Asn Ala Lys Gly Ser Ile Tyr Ile
 4325 4330 4335
 Gly Gly Ala Pro Asp Val Ala Thr Leu Thr Gly Gly Arg Phe Ser Ser
 30 4340 4345 4350
 Gly Ile Thr Gly Cys Val Lys Asn Leu Val Leu His Ser Ala Arg Pro
 4355 4360 4365
 Gly Ala Pro Pro Pro Gln Pro Leu Asp Leu Gln His Arg Ala Gln Ala
 35 4370 4375 4380
 Gly Ala Asn Thr Arg Pro Cys Pro Ser
 4385 4390
 40
 <210> 2
 <211> 195
 <212> PRT
 45 <213> Homo sapiens
 <400> 2
 Asp Ala Pro Gly Gln Tyr Gly Ala Tyr Phe His Asp Asp Gly Phe Leu
 1 5 10 15
 50 Ala Phe Pro Gly His Val Phe Ser Arg Ser Leu Pro Glu Val Pro Glu
 20 25 30
 Thr Ile Glu Leu Glu Val Arg Thr Ser Thr Ala Ser Gly Leu Leu Leu
 55 35 40 45
 Trp Gln Gly Val Glu Val Gly Glu Ala Gly Gln Gly Lys Asp Phe Ile
 50 55 60

Ser Leu Gly Leu Gln Asp Gly His Leu Val Phe Arg Tyr Gln Leu Gly
 65 70 75 80

5 Ser Gly Glu Ala Arg Leu Val Ser Glu Asp Pro Ile Asn Asp Gly Glu
 85 90 95

Trp His Arg Val Thr Ala Leu Arg Glu Gly Arg Arg Gly Ser Ile Gln
 100 105 110

10 Val Asp Gly Glu Glu Leu Val Ser Gly Arg Ser Pro Gly Pro Asn Val
 115 120 125

15 Ala Val Asn Ala Lys Gly Ser Val Tyr Ile Gly Gly Ala Pro Asp Val
 130 135 140

Ala Thr Leu Thr Gly Gly Arg Phe Ser Ser Gly Ile Thr Gly Cys Val
 145 150 155 160

20 Lys Asn Leu Val Leu His Ser Ala Arg Pro Gly Ala Pro Pro Pro Gln
 165 170 175

Pro Leu Asp Leu Gln His Arg Ala Gln Ala Gly Ala Asn Thr Arg Pro
 180 185 190

25 Cys Pro Ser
 195

30
 <210> 3
 <211> 508
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

35
 <400> 3
 Arg Thr Cys Arg Cys Lys Asn Asn Val Val Gly Arg Leu Cys Asn Glu
 1 5 10 15

40 Cys Ala Asp Arg Ser Phe His Leu Ser Thr Arg Asn Pro Asp Gly Cys
 20 25 30

Leu Lys Cys Phe Cys Met Gly Val Ser Arg His Cys Thr Ser Ser Ser
 35 40 45

45 Trp Ser Arg Ala Gln Leu His Gly Ala Ser Glu Glu Pro Gly His Phe
 50 55 60

50 Ser Leu Thr Asn Ala Ala Ser Thr His Thr Thr Asn Glu Gly Ile Phe
 65 70 75 80

Ser Pro Thr Pro Gly Glu Leu Gly Phe Ser Ser Phe His Arg Leu Leu
 85 90 95

55 Ser Gly Pro Tyr Phe Trp Ser Leu Pro Ser Arg Phe Leu Gly Asp Lys
 100 105 110

Val Thr Ser Tyr Gly Gly Glu Leu Arg Phe Thr Val Thr Gln Arg Ser

	115	120	125
	Gln Pro Gly Ser Thr Pro	Leu His Gly Gln Pro	Leu Val Val Leu Gln
	130	135	140
5	Gly Asn Asn Ile Ile Leu	Glu His His Val Ala	Gln Glu Pro Ser Pro
	145	150	155 160
10	Gly Gln Pro Ser Thr Phe	Ile Val Pro Phe Arg	Glu Gln Ala Trp Gln
	165	170	175
	Arg Pro Asp Gly Gln Pro	Ala Thr Arg Glu His	Leu Leu Met Ala Leu
	180	185	190
15	Ala Gly Ile Asp Thr Leu	Leu Ile Arg Ala Ser	Tyr Ala Gln Gln Pro
	195	200	205
	Ala Glu Ser Arg Leu Ser	Gly Ile Ser Met Asp	Val Ala Val Pro Glu
	210	215	220
20	Glu Thr Gly Gln Asp Pro	Ala Leu Glu Val Glu	Gln Cys Ser Cys Pro
	225	230	235 240
25	Pro Gly Tyr Leu Gly Pro	Ser Cys Gln Asp Cys	Asp Thr Gly Tyr Thr
	245	250	255
	Arg Thr Pro Ser Gly Leu	Tyr Leu Gly Thr Cys	Glu Arg Cys Ser Cys
	260	265	270
30	His Gly His Ser Glu Ala	Cys Glu Pro Glu Thr	Gly Ala Cys Gln Gly
	275	280	285
	Cys Gln His His Thr Glu	Gly Pro Arg Cys Glu	Gln Cys Gln Pro Gly
	290	295	300
35	Tyr Tyr Gly Asp Ala Gln	Arg Gly Thr Pro Gln	Asp Cys Gln Leu Cys
	305	310	315 320
40	Pro Cys Tyr Gly Asp Pro	Ala Ala Gly Gln Ala	Ala Leu Thr Cys Phe
	325	330	335
	Leu Asp Thr Asp Gly His	Pro Thr Cys Asp Ala	Cys Ser Pro Gly His
	340	345	350
45	Ser Gly Arg His Cys Glu	Arg Cys Ala Pro Gly	Tyr Tyr Gly Asn Pro
	355	360	365
	Ser Gln Gly Gln Pro Cys	Gln Arg Asp Ser Gln	Val Pro Gly Pro Ile
	370	375	380
50	Gly Cys Asn Cys Asp Pro	Gln Gly Ser Val Ser	Ser Gln Cys Asp Ala
	385	390	395 400
55	Ala Gly Gln Cys Gln Cys	Lys Ala Gln Val Glu	Gly Leu Thr Cys Ser
	405	410	415
	His Cys Arg Pro His His	Phe His Leu Ser Ala	Ser Asn Pro Asp Gly
	420	425	430

Cys Leu Pro Cys Phe Cys Met Gly Ile Thr Gln Gln Cys Ala Ser Ser
 435 440 445
 5 Ala Tyr Thr Arg His Leu Ile Ser Thr His Phe Ala Pro Gly Asp Phe
 450 455 460
 Gln Gly Phe Ala Leu Val Asn Pro Gln Arg Asn Ser Arg Leu Thr Gly
 465 470 475 480
 10 Glu Phe Thr Val Glu Pro Val Pro Glu Gly Ala Gln Leu Ser Phe Gly
 485 490 495
 Asn Phe Ala Gln Leu Gly His Glu Ser Phe Tyr Trp
 15 500 505
 <210> 4
 20 <211> 199
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 4
 25 Met Lys Trp Val Trp Ala Leu Leu Leu Leu Ala Ala Trp Ala Ala Ala
 1 5 10 15
 Glu Arg Asp Cys Arg Val Ser Ser Phe Arg Val Lys Glu Asn Phe Asp
 20 25 30
 30 Lys Ala Arg Phe Ser Gly Thr Trp Tyr Ala Met Ala Lys Lys Asp Pro
 35 40 45
 Glu Gly Leu Phe Leu Gln Asp Asn Ile Val Ala Glu Phe Ser Val Asp
 35 50 55 60
 Glu Thr Gly Gln Met Ser Ala Thr Ala Lys Gly Arg Val Arg Leu Leu
 65 70 75 80
 40 Asn Asn Trp Asp Val Cys Ala Asp Met Val Gly Thr Phe Thr Asp Thr
 85 90 95
 Glu Asp Pro Ala Lys Phe Lys Met Lys Tyr Trp Gly Val Ala Ser Phe
 100 105 110
 45 Leu Gln Lys Gly Asn Asp Asp His Trp Ile Val Asp Thr Asp Tyr Asp
 115 120 125
 Thr Tyr Ala Val Gln Tyr Ser Cys Arg Leu Leu Asn Leu Asp Gly Thr
 50 130 135 140
 Cys Ala Asp Ser Tyr Ser Phe Val Phe Ser Arg Asp Pro Asn Gly Leu
 145 150 155 160
 55 Pro Pro Glu Ala Gln Lys Ile Val Arg Gln Arg Gln Glu Glu Leu Cys
 165 170 175
 Leu Ala Arg Gln Tyr Arg Leu Ile Val His Asn Gly Tyr Cys Asp Gly

180 185 190
 Arg Ser Glu Arg Asn Leu Leu
 195
 5
 <210> 5
 <211> 199
 10 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 5
 15 Met Lys Trp Val Trp Ala Leu Leu Leu Ala Ala Trp Ala Ala Ala
 1 5 10 15
 Glu Arg Asp Cys Arg Val Ser Ser Phe Arg Val Lys Glu Asn Phe Asp
 20 20 25 30
 Lys Ala Arg Phe Ser Gly Thr Trp Tyr Ala Met Ala Lys Lys Asp Pro
 25 35 40 45
 Glu Gly Leu Phe Leu Gln Asp Asn Ile Val Ala Glu Phe Ser Val Asp
 50 55 60
 25 Glu Thr Gly Gln Met Ser Ala Thr Ala Lys Gly Arg Val Arg Leu Leu
 65 70 75 80
 Asn Asn Trp Asp Val Cys Ala Asp Met Val Gly Thr Phe Thr Asp Thr
 30 85 90 95
 Glu Asp Pro Ala Lys Phe Lys Met Lys Tyr Trp Gly Val Ala Ser Phe
 100 105 110
 35 Leu Gln Lys Gly Asn Asp Asp His Trp Ile Val Asp Thr Asp Tyr Asp
 115 120 125
 Thr Tyr Ala Val Gln Tyr Ser Cys Arg Leu Leu Asn Leu Asp Gly Thr
 40 130 135 140
 Cys Ala Asp Ser Tyr Ser Phe Val Phe Ser Arg Asp Pro Asn Gly Leu
 145 150 155 160
 45 Pro Pro Glu Ala Gln Lys Ile Val Arg Gln Arg Gln Glu Glu Leu Cys
 165 170 175
 Leu Ala Arg Gln Tyr Arg Leu Ile Val His Asn Gly Tyr Cys Asp Gly
 180 185 190
 50 Arg Ser Glu Arg Asn Leu Leu
 195
 55 <210> 6
 <211> 199
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6
 Met Lys Trp Val Trp Ala Leu Leu Leu Leu Ala Ala Trp Ala Ala Ala
 1 5 10 15
 5 Glu Arg Asp Cys Arg Val Ser Ser Phe Arg Val Lys Glu Asn Phe Asp
 20 25 30
 10 Lys Ala Arg Phe Ser Gly Thr Trp Tyr Ala Met Ala Lys Lys Asp Pro
 35 40 45
 Glu Gly Leu Phe Leu Gln Asp Asn Ile Val Ala Glu Phe Ser Val Asp
 50 55 60
 15 Glu Thr Gly Gln Met Ser Ala Thr Ala Lys Gly Arg Val Arg Leu Leu
 65 70 75 80
 Asn Asn Trp Asp Val Cys Ala Asp Met Val Gly Thr Phe Thr Asp Thr
 85 90 95
 20 Glu Asp Pro Ala Lys Phe Lys Met Lys Tyr Trp Gly Val Ala Ser Phe
 100 105 110
 25 Leu Gln Lys Gly Asn Asp Asp His Trp Ile Val Asp Thr Asp Tyr Asp
 115 120 125
 Thr Tyr Ala Val Gln Tyr Ser Cys Arg Leu Leu Asn Leu Asp Gly Thr
 130 135 140
 30 Cys Ala Asp Ser Tyr Ser Phe Val Phe Ser Arg Asp Pro Asn Gly Leu
 145 150 155 160
 Pro Pro Glu Ala Gln Lys Ile Val Arg Gln Arg Gln Glu Glu Leu Cys
 165 170 175
 35 Leu Ala Arg Gln Tyr Arg Leu Ile Val His Asn Gly Tyr Cys Asp Gly
 180 185 190
 40 Arg Ser Glu Arg Asn Leu Leu
 195

<210> 7
 45 <211> 182
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 7
 50 Glu Arg Asp Cys Arg Val Ser Ser Phe Arg Val Lys Glu Asn Phe Asp
 1 5 10 15
 Lys Ala Arg Phe Ser Gly Thr Trp Tyr Ala Met Ala Lys Lys Asp Pro
 20 25 30
 55 Glu Gly Leu Phe Leu Gln Asp Asn Ile Val Ala Glu Phe Ser Val Asp
 35 40 45

Glu Thr Gly Gln Met Ser Ala Thr Ala Lys Gly Arg Val Arg Leu Leu
 50 55 60

Asn Asn Trp Asp Val Cys Ala Asp Met Val Gly Thr Phe Thr Asp Thr
 5 65 70 75 80

Glu Asp Pro Ala Lys Phe Lys Met Lys Tyr Trp Gly Val Ala Ser Phe
 85 90 95

10 Leu Gln Lys Gly Asn Asp Asp His Trp Ile Val Asp Thr Asp Tyr Asp
 100 105 110

Thr Tyr Ala Val Gln Tyr Ser Cys Arg Leu Leu Asn Leu Asp Gly Thr
 115 120 125

15 Cys Ala Asp Ser Tyr Ser Phe Val Phe Ser Arg Asp Pro Asn Gly Leu
 130 135 140

Pro Pro Glu Ala Gln Lys Ile Val Arg Gln Arg Gln Glu Glu Leu Cys
 20 145 150 155 160

Leu Ala Arg Gln Tyr Arg Leu Ile Val His Asn Gly Tyr Cys Asp Gly
 165 170 175

25 Arg Ser Glu Arg Asn Leu
 180

30 <210> 8
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

35 <400> 8
 Met Gln Ser Leu Met Gln Ala Pro Leu Leu Ile Ala Leu Gly Leu Leu
 1 5 10 15

40 Leu Ala Thr Pro Ala Gln Ala His Leu Lys Lys Pro Ser Gln Leu Ser
 20 25 30

Ser Phe Ser Trp Asp Asn Cys Asp Glu Gly Lys Asp Pro Ala Val Ile
 35 40 45

45 Arg Ser Leu Thr Leu Glu Pro Asp Pro Ile Val Val Pro Gly Asn Val
 50 55 60

Thr Leu Ser Val Val Gly Ser Thr Ser Val Pro Leu Ser Ser Pro Leu
 65 70 75 80

50 Lys Val Asp Leu Val Leu Glu Lys Glu Val Ala Gly Leu Trp Ile Lys
 85 90 95

Ile Pro Cys Thr Asp Tyr Ile Gly Ser Cys Thr Phe Glu His Phe Cys
 55 100 105 110

Asp Val Leu Asp Met Leu Ile Pro Thr Gly Glu Pro Cys Pro Glu Pro
 115 120 125

Leu Arg Thr Tyr Gly Leu Pro Cys His Cys Pro Phe Lys Glu Gly Thr
 130 135 140

5 Tyr Ser Leu Pro Lys Ser Glu Phe Val Val Pro Asp Leu Glu Leu Pro
 145 150 155 160

Ser Trp Leu Thr Thr Gly Asn Tyr Arg Ile Glu Ser Val Leu Ser Ser
 165 170 175

10 Ser Gly Lys Arg Leu Gly Cys Ile Lys Ile Ala Ala Ser Leu Lys Gly
 180 185 190

Ile
 15

<210> 9
 20 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 9
 25 Met Gln Ser Leu Met Gln Ala Pro Leu Leu Ile Ala Leu Gly Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Ala Thr Pro Ala Gln Ala His Leu Lys Lys Pro Ser Gln Leu Ser
 20 25 30

30 Ser Phe Ser Trp Asp Asn Cys Phe Glu Gly Lys Asp Pro Ala Val Ile
 35 40 45

Arg Ser Leu Thr Leu Glu Pro Asp Pro Ile Val Val Pro Gly Asn Val
 35 50 55 60

Thr Leu Ser Val Val Gly Ser Thr Ser Val Pro Leu Ser Ser Pro Leu
 65 70 75 80

40 Lys Val Asp Leu Val Leu Glu Lys Glu Val Ala Gly Leu Trp Ile Lys
 85 90 95

Ile Pro Cys Thr Asp Tyr Ile Gly Ser Cys Thr Phe Glu His Phe Cys
 100 105 110

45 Asp Val Leu Asp Met Leu Ile Pro Thr Gly Glu Pro Cys Pro Glu Pro
 115 120 125

Leu Arg Thr Tyr Gly Leu Pro Cys His Cys Pro Phe Lys Glu Gly Thr
 50 130 135 140

Tyr Ser Leu Pro Lys Ser Glu Phe Ala Val Pro Asp Leu Glu Leu Pro
 145 150 155 160

55 Ser Trp Leu Thr Thr Gly Asn Tyr Arg Ile Glu Ser Val Leu Ser Ser
 165 170 175

Ser Gly Lys Arg Leu Gly Cys Ile Lys Ile Ala Ala Ser Leu Lys Gly

180 185 190

Ile

5

<210> 10
 <211> 178
 10 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10
 15 Leu Leu Ala Thr Pro Ala Gln Ala His Leu Lys Lys Pro Ser Gln Leu
 1 5 10 15

Ser Ser Phe Ser Trp Asp Asn Cys Asp Glu Gly Lys Asp Pro Ala Val
 20 20 25 30

Ile Arg Ser Leu Thr Leu Glu Pro Asp Pro Ile Val Val Pro Gly Asn
 25 35 40 45

Val Thr Leu Ser Val Val Gly Ser Thr Ser Val Pro Leu Ser Ser Pro
 50 55 60

25 Leu Lys Val Asp Leu Val Leu Glu Lys Glu Val Ala Gly Leu Trp Ile
 65 70 75 80

Lys Ile Pro Cys Thr Asp Tyr Ile Gly Ser Cys Thr Phe Glu His Phe
 30 85 90 95

Cys Asp Val Leu Asp Met Leu Ile Pro Thr Gly Glu Pro Cys Pro Glu
 100 105 110

35 Pro Leu Arg Thr Tyr Gly Leu Pro Cys His Cys Pro Phe Lys Glu Gly
 115 120 125

Thr Tyr Ser Leu Pro Lys Ser Glu Phe Val Val Pro Asp Leu Glu Leu
 130 135 140

40 Pro Ser Trp Leu Thr Thr Gly Asn Tyr Arg Ile Glu Ser Val Leu Ser
 145 150 155 160

Ser Ser Gly Lys Arg Leu Gly Cys Ile Lys Ile Ala Ala Ser Leu Lys
 45 165 170 175

Gly Ile

50

<210> 11
 <211> 200
 <212> PRT
 55 <213> Homo sapiens

<400> 11
 Arg Ala Gly Pro Pro Phe Pro Met Gln Ser Leu Met Gln Ala Pro Leu

Val Gly Ser Thr Ser Val Pro Leu Ser Ser Pro Leu Lys Val Asp Leu
 65 70 75 80
 Val Leu Glu Lys Glu Val Ala Gly Leu Trp Ile Lys Ile Pro Cys Thr
 5 85 90 95
 Asp Tyr Ile Gly Ser Cys Thr Phe Glu His Phe Cys Asp Val Leu Asp
 100 105 110
 10 Met Leu Ile Pro Thr Gly Glu Pro Cys Pro Glu Pro Leu Arg Thr Tyr
 115 120 125
 Gly Leu Pro Cys His Cys Pro Phe Lys Glu Gly Thr Tyr Ser Leu Pro
 130 135 140
 15 Lys Ser Glu Phe Val Val Pro Asp Leu Glu Leu Pro Ser Trp Leu Thr
 145 150 155 160
 Thr Gly Asn Tyr Arg Ile Glu Ser Val Leu Ser Ser Ser Gly Lys Arg
 20 165 170 175
 Leu Gly Cys Ile Lys Ile Ala Ala Ser Leu Lys Gly Ile
 180 185
 25
 <210> 13
 <211> 193
 <212> PRT
 30 <213> Homo sapiens
 <400> 13
 Met Gln Ser Leu Met Gln Ala Pro Leu Leu Ile Ala Leu Gly Leu Leu
 1 5 10 15
 35 Leu Ala Thr Pro Ala Gln Ala His Leu Lys Lys Pro Ser Gln Leu Ser
 20 25 30
 Ser Phe Ser Trp Asp Asn Cys Asp Glu Gly Lys Asp Pro Ala Val Ile
 40 35 40 45
 Arg Ser Leu Thr Leu Glu Pro Asp Pro Ile Val Val Pro Gly Asn Val
 50 55 60
 45 Thr Leu Ser Val Val Gly Ser Thr Ser Val Pro Leu Ser Ser Pro Leu
 65 70 75 80
 Lys Val Asp Leu Val Leu Glu Lys Glu Val Ala Gly Leu Trp Ile Lys
 85 90 95
 50 Ile Pro Cys Thr Asp Tyr Ile Gly Ser Cys Thr Phe Glu His Phe Cys
 100 105 110
 Asp Val Leu Asp Met Leu Ile Pro Thr Gly Glu Pro Cys Pro Glu Pro
 55 115 120 125
 Leu Arg Thr Tyr Gly Leu Pro Cys His Cys Pro Phe Lys Glu Gly Thr
 130 135 140

Tyr Ser Leu Pro Lys Ser Glu Phe Val Val Pro Asp Leu Glu Leu Pro
 145 150 155 160
 5 Ser Trp Leu Thr Thr Gly Asn Tyr Arg Ile Glu Ser Val Leu Ser Ser
 165 170 175
 Ser Gly Lys Arg Leu Gly Cys Ile Lys Ile Ala Ala Ser Leu Lys Gly
 180 185 190
 10 Ile
 15
 <210> 14
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 20
 <400> 14
 Met Gln Ser Leu Met Gln Ala Pro Leu Leu Ile Ala Leu Gly Leu Leu
 1 5 10 15
 25 Leu Ala Thr Pro Ala Gln Ala His Leu Lys Lys Pro Ser Gln Leu Ser
 20 25 30
 Ser Phe Ser Trp Asp Asn Cys Asp Glu Gly Lys Asp Pro Ala Val Ile
 35 40 45
 30 Arg Ser Leu Thr Leu Glu Pro Asp Pro Ile Val Val Pro Gly Asn Val
 50 55 60
 Thr Leu Ser Val Val Gly Ser Thr Ser Val Pro Leu Ser Ser Pro Leu
 35 65 70 75 80
 Lys Val Asp Leu Val Leu Glu Lys Glu Val Ala Gly Leu Trp Ile Lys
 85 90 95
 40 Ile Pro Cys Thr Asp Tyr Ile Gly Ser Cys Thr Phe Glu His Phe Cys
 100 105 110
 Asp Val Leu Asp Met Leu Ile Pro Thr Gly Glu Pro Cys Pro Glu Pro
 115 120 125
 45 Leu Arg Thr Tyr Gly Leu Pro Cys His Cys Pro Phe Lys Glu Gly Thr
 130 135 140
 Tyr Ser Leu Pro Lys Ser Glu Phe Val Val Pro Asp Leu Glu Leu Pro
 50 145 150 155 160
 Ser Trp Leu Thr Thr Gly Asn Tyr Arg Ile Glu Ser Val Leu Ser Ser
 165 170 175
 55 Ser Gly Lys Arg Leu Gly Cys Ile Lys Ile Ala Ala Ser Leu Lys Gly
 180 185 190
 Ile

5 <210> 15
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 15
 Met Gln Ser Leu Met Gln Ala Pro Leu Leu Ile Ala Leu Gly Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Ala Thr Pro Ala Gln Ala His Leu Lys Lys Pro Ser Gln Leu Ser
 15 20 25 30
 Ser Phe Ser Trp Asp Asn Cys Asp Glu Gly Lys Asp Pro Ala Val Ile
 35 40 45
 Arg Ser Leu Thr Leu Glu Pro Asp Pro Ile Val Val Pro Gly Asn Val
 50 55 60
 Thr Leu Ser Val Val Gly Ser Thr Ser Val Pro Leu Ser Ser Pro Leu
 65 70 75 80
 25 Lys Val Asp Leu Val Leu Glu Lys Glu Val Ala Gly Leu Trp Ile Lys
 85 90 95
 Ile Pro Cys Thr Asp Tyr Ile Gly Ser Cys Thr Phe Glu His Phe Cys
 30 100 105 110
 Asp Val Leu Asp Met Leu Ile Pro Thr Gly Glu Pro Cys Pro Glu Pro
 115 120 125
 35 Leu Arg Thr Tyr Gly Leu Pro Cys His Cys Pro Phe Lys Glu Gly Thr
 130 135 140
 Tyr Ser Leu Pro Lys Ser Glu Phe Val Val Pro Asp Leu Glu Leu Pro
 145 150 155 160
 40 Ser Trp Leu Thr Thr Gly Asn Tyr Arg Ile Glu Ser Val Leu Ser Ser
 165 170 175
 Ser Gly Lys Arg Leu Gly Cys Ile Lys Ile Ala Ala Ser Leu Lys Gly
 45 180 185 190
 Ile

50
 <210> 16
 <211> 193
 <212> PRT
 55 <213> Homo sapiens

<400> 16
 Met Gln Ser Leu Met Gln Ala Pro Leu Leu Ile Ala Leu Gly Leu Leu

1 5 10 15
 Leu Ala Thr Pro Ala Gln Ala His Leu Lys Lys Pro Ser Gln Leu Ser
 20 25 30
 5 Ser Phe Ser Trp Asp Asn Cys Asp Glu Gly Lys Asp Pro Ala Val Ile
 35 40 45
 Arg Ser Leu Thr Leu Glu Pro Asp Pro Ile Val Val Pro Gly Asn Val
 10 50 55 60
 Thr Leu Ser Val Val Gly Ser Thr Ser Val Pro Leu Ser Ser Pro Leu
 65 70 75 80
 15 Lys Val Asp Leu Val Leu Glu Lys Glu Val Ala Gly Leu Trp Ile Lys
 85 90 95
 Ile Pro Cys Thr Asp Tyr Ile Gly Ser Cys Thr Phe Glu His Phe Cys
 100 105 110
 20 Asp Val Leu Asp Met Leu Ile Pro Thr Gly Glu Pro Cys Pro Glu Pro
 115 120 125
 Leu Arg Thr Tyr Gly Leu Pro Cys His Cys Pro Phe Lys Glu Gly Thr
 25 130 135 140
 Tyr Ser Leu Pro Lys Ser Glu Phe Val Val Pro Asp Leu Glu Leu Pro
 145 150 155 160
 30 Ser Trp Leu Thr Thr Gly Asn Tyr Arg Ile Glu Ser Val Leu Ser Ser
 165 170 175
 Ser Gly Lys Arg Leu Gly Cys Ile Lys Ile Ala Ala Ser Leu Lys Gly
 180 185 190
 35 Ile

 40
 <210> 17
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 45
 <400> 17
 Met Thr Cys Lys Met Ser Gln Leu Glu Arg Asn Ile Glu Thr Ile Ile
 1 5 10 15
 50 Asn Thr Phe His Gln Tyr Ser Val Lys Leu Gly His Pro Asp Thr Leu
 20 25 30
 Asn Gln Gly Glu Phe Lys Glu Leu Val Arg Lys Asp Leu Gln Asn Phe
 35 40 45
 55 Leu Lys Lys Glu Asn Lys Asn Glu Lys Val Ile Glu His Ile Met Glu
 50 55 60

Asp Leu Asp Thr Asn Ala Asp Lys Gln Leu Ser Phe Glu Glu Phe Ile
 65 70 75 80
 Met Leu Met Ala Arg Leu Thr Trp Ala Ser His Glu Lys Met His Glu
 5 85 90 95
 Gly Asp Glu Gly Pro Gly His His His Lys Pro Gly Leu Gly Glu Gly
 100 105 110
 10 Thr Pro
 15 <210> 18
 <211> 93
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 20 <400> 18
 Met Leu Thr Glu Leu Glu Lys Ala Leu Asn Ser Ile Ile Asp Val Tyr
 1 5 10 15
 His Lys Tyr Ser Leu Ile Lys Gly Asn Phe His Ala Val Tyr Arg Asp
 25 20 25 30
 Asp Leu Lys Lys Leu Leu Glu Thr Glu Cys Pro Gln Tyr Ile Arg Lys
 35 40 45
 30 Lys Gly Ala Asp Val Trp Phe Lys Glu Leu Asp Ile Asn Thr Asp Gly
 50 55 60
 Ala Val Asn Phe Gln Glu Phe Leu Ile Leu Val Ile Lys Met Gly Val
 65 70 75 80
 35 Ala Ala His Lys Lys Ser His Glu Glu Ser His Lys Glu
 85 90
 40 <210> 19
 <211> 92
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 45 <400> 19
 Met Thr Lys Leu Glu Glu His Leu Glu Gly Ile Val Asn Ile Phe His
 1 5 10 15
 50 Gln Tyr Ser Val Arg Lys Gly His Phe Asp Thr Leu Ser Lys Gly Glu
 20 25 30
 Leu Lys Gln Leu Leu Thr Lys Glu Leu Ala Asn Thr Ile Lys Asn Ile
 35 40 45
 55 Lys Asp Lys Ala Val Ile Asp Glu Ile Phe Gln Gly Leu Asp Ala Asn
 50 55 60

Gln Asp Glu Gln Val Asp Phe Gln Glu Phe Ile Ser Leu Val Ala Ile
 65 70 75 80
 Ala Leu Lys Ala Ala His Tyr His Thr His Lys Glu
 5 85 90
 <210> 20
 10 <211> 92
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 20
 15 Met Thr Lys Leu Glu Glu His Leu Glu Gly Ile Val Asn Ile Phe His
 1 5 10 15
 Gln Tyr Ser Val Arg Lys Gly His Phe Asp Thr Leu Ser Lys Gly Glu
 20 20 25 30
 Leu Lys Gln Leu Leu Thr Lys Glu Leu Ala Asn Thr Ile Lys Asn Ile
 35 40 45
 Lys Asp Lys Ala Val Ile Asp Glu Ile Phe Gln Gly Leu Asp Ala Asn
 25 50 55 60
 Gln Asp Glu Gln Val Asp Phe Gln Glu Phe Ile Ser Leu Val Ala Ile
 65 70 75 80
 30 Ala Leu Lys Ala Ala His Tyr His Thr His Lys Glu
 85 90
 35 <210> 21
 <211> 91
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 40 <400> 21
 Thr Lys Leu Glu Glu His Leu Glu Gly Ile Val Asn Ile Phe His Gln
 1 5 10 15
 Tyr Ser Val Arg Lys Gly His Phe Asp Thr Leu Ser Lys Gly Glu Leu
 45 20 25 30
 Lys Gln Leu Leu Thr Lys Glu Leu Ala Asn Thr Ile Lys Asn Ile Lys
 35 40 45
 50 Asp Lys Ala Val Ile Asp Glu Ile Phe Gln Gly Leu Asp Ala Asn Gln
 50 55 60
 Asp Glu Gln Val Asp Phe Gln Glu Phe Ile Ser Leu Val Ala Ile Ala
 65 70 75 80
 55 Leu Lys Ala Ala His Tyr His Thr His Lys Glu
 85 90

<210> 22
 <211> 93
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 22
 10 Met Leu Thr Glu Leu Glu Lys Ala Leu Asn Ser Ile Ile Asp Val Tyr
 1 5 10 15
 His Lys Tyr Ser Leu Ile Lys Gly Asn Phe His Ala Val Tyr Arg Asp
 20 25 30
 15 Asp Leu Lys Lys Leu Leu Glu Thr Glu Cys Pro Gln Tyr Ile Arg Lys
 35 40 45
 Lys Gly Ala Asp Val Trp Phe Lys Glu Leu Asp Ile Asn Thr Asp Gly
 50 55 60
 20 Ala Val Asn Phe Gln Glu Phe Leu Ile Leu Val Ile Lys Met Gly Val
 65 70 75 80
 Ala Ala His Lys Lys Ser His Glu Glu Ser His Lys Glu
 25 85 90

<210> 23
 30 <211> 92
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 23
 35 Met Thr Lys Leu Glu Glu His Leu Glu Gly Ile Val Asn Ile Phe His
 1 5 10 15
 Gln Tyr Ser Val Arg Lys Gly His Phe Asp Thr Leu Ser Lys Gly Glu
 20 25 30
 40 Leu Lys Gln Leu Leu Thr Lys Glu Leu Ala Asn Thr Ile Lys Asn Ile
 35 40 45
 Lys Asp Lys Ala Val Ile Asp Glu Ile Phe Gln Gly Leu Asp Ala Asn
 45 50 55 60
 Gln Asp Glu Gln Val Asp Phe Gln Glu Phe Ile Ser Leu Val Ala Ile
 65 70 75 80
 50 Ala Leu Lys Ala Ala His Tyr His Thr His Lys Glu
 85 90

55 <210> 24
 <211> 85
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 24
 Asp Asn Gly Asp Val Cys Gln Asp Cys Ile Gln Met Val Thr Asp Ile
 1 5 10 15
 5 Gln Thr Ala Val Arg Thr Asn Ser Thr Phe Val Gln Ala Leu Val Glu
 20 25 30
 10 His Val Lys Glu Glu Cys Asp Arg Leu Gly Pro Gly Met Ala Asp Ile
 35 40 45
 Cys Lys Asn Tyr Ile Ser Gln Tyr Ser Glu Ile Ala Ile Gln Met Met
 50 55 60
 15 Met His Met Gln Asp Gln Gln Pro Lys Glu Ile Cys Ala Leu Val Gly
 65 70 75 80
 Phe Cys Asp Glu Val
 85
 20
 <210> 25
 <211> 381
 25 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 25
 Met Ala Glu Ser His Leu Leu Gln Trp Leu Leu Leu Leu Leu Pro Thr
 1 5 10 15
 30 Leu Cys Gly Pro Gly Thr Ala Ala Trp Thr Thr Ser Ser Leu Ala Cys
 20 25 30
 35 Ala Gln Gly Pro Glu Phe Trp Cys Gln Ser Leu Glu Gln Ala Leu Gln
 35 40 45
 Cys Arg Ala Leu Gly His Cys Leu Gln Glu Val Trp Gly His Val Gly
 50 55 60
 40 Ala Asp Asp Leu Cys Gln Glu Cys Glu Asp Ile Val His Ile Leu Asn
 65 70 75 80
 Lys Met Ala Lys Glu Ala Ile Phe Gln Asp Thr Met Arg Lys Phe Leu
 85 90 95
 45 Glu Gln Glu Cys Asn Val Leu Pro Leu Lys Leu Leu Met Pro Gln Cys
 100 105 110
 50 Asn Gln Val Leu Asp Asp Tyr Phe Pro Leu Val Ile Asp Tyr Phe Gln
 115 120 125
 Asn Gln Ile Asp Ser Asn Gly Ile Cys Met His Leu Gly Leu Cys Lys
 130 135 140
 55 Ser Arg Gln Pro Glu Pro Glu Gln Glu Pro Gly Met Ser Asp Pro Leu
 145 150 155 160

Pro Lys Pro Leu Arg Asp Pro Leu Pro Asp Pro Leu Leu Asp Lys Leu
 165 170 175
 Val Leu Pro Val Leu Pro Gly Ala Leu Gln Ala Arg Pro Gly Pro His
 180 185 190
 Thr Gln Asp Leu Ser Glu Gln Gln Phe Pro Ile Pro Leu Pro Tyr Cys
 195 200 205
 Trp Leu Cys Arg Ala Leu Ile Lys Arg Ile Gln Ala Met Ile Pro Lys
 210 215 220
 Gly Ala Leu Arg Val Ala Val Ala Gln Val Cys Arg Val Val Pro Leu
 225 230 235 240
 Val Ala Gly Gly Ile Cys Gln Cys Leu Ala Glu Arg Tyr Ser Val Ile
 245 250 255
 Leu Leu Asp Thr Leu Leu Gly Arg Met Leu Pro Gln Leu Val Cys Arg
 260 265 270
 Leu Val Leu Arg Cys Ser Met Asp Asp Ser Ala Gly Pro Arg Ser Pro
 275 280 285
 Thr Gly Glu Trp Leu Pro Arg Asp Ser Glu Cys His Leu Cys Met Ser
 290 295 300
 Val Thr Thr Gln Ala Gly Asn Ser Ser Glu Gln Ala Ile Pro Gln Ala
 305 310 315 320
 Met Leu Gln Ala Cys Val Gly Ser Trp Leu Asp Arg Glu Lys Cys Lys
 325 330 335
 Gln Phe Val Glu Gln His Thr Pro Gln Leu Leu Thr Leu Val Pro Arg
 340 345 350
 Gly Trp Asp Ala His Thr Thr Cys Gln Ala Leu Gly Val Cys Gly Thr
 355 360 365
 Met Ser Ser Pro Leu Gln Cys Ile His Ser Pro Asp Leu
 370 375 380
 <210> 26
 <211> 379
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 26
 Met Ala Glu Ser His Leu Leu Gln Trp Leu Leu Leu Leu Leu Pro Thr
 1 5 10 15
 Leu Cys Gly Pro Gly Thr Ala Ala Trp Thr Thr Ser Ser Leu Ala Cys
 20 25 30
 Ala Gln Gly Pro Glu Phe Trp Cys Gln Ser Leu Glu Gln Ala Leu Gln
 35 40 45

	Cys	Arg	Ala	Leu	Gly	His	Cys	Leu	Gln	Glu	Val	Trp	Gly	His	Val	Gly	
	50						55					60					
5	Ala	Asp	Asp	Leu	Cys	Gln	Glu	Cys	Glu	Asp	Ile	Val	His	Ile	Leu	Asn	
	65					70				75						80	
	Lys	Met	Ala	Lys	Glu	Ala	Ile	Phe	Gln	Asp	Thr	Met	Arg	Lys	Phe	Leu	
					85					90					95		
10	Glu	Gln	Glu	Cys	Asn	Val	Leu	Pro	Leu	Lys	Leu	Leu	Met	Pro	Gln	Cys	
				100					105					110			
	Asn	Gln	Val	Leu	Asp	Asp	Tyr	Phe	Pro	Leu	Val	Ile	Asp	Tyr	Phe	Gln	
15			115					120					125				
	Asn	Gln	Thr	Asp	Ser	Asn	Gly	Ile	Cys	Met	His	Leu	Gly	Cys	Lys	Ser	
	130						135					140					
20	Arg	Gln	Pro	Glu	Pro	Glu	Gln	Glu	Pro	Gly	Met	Ser	Asp	Pro	Leu	Pro	
	145					150					155					160	
	Lys	Pro	Leu	Arg	Asp	Pro	Leu	Pro	Asp	Pro	Leu	Leu	Asp	Lys	Leu	Val	
				165					170						175		
25	Leu	Pro	Val	Leu	Pro	Gly	Ala	Leu	Gln	Ala	Arg	Pro	Gly	Pro	His	Thr	
				180				185						190			
	Gln	Asp	Leu	Ser	Glu	Gln	Gln	Phe	Pro	Ile	Pro	Leu	Pro	Tyr	Cys	Trp	
30			195					200					205				
	Cys	Arg	Ala	Leu	Ile	Lys	Arg	Ile	Gln	Ala	Met	Ile	Pro	Lys	Gly	Ala	
	210						215					220					
35	Leu	Arg	Val	Ala	Val	Ala	Gln	Val	Cys	Arg	Val	Val	Pro	Leu	Val	Ala	
	225					230					235					240	
	Gly	Gly	Ile	Cys	Gln	Cys	Leu	Ala	Glu	Arg	Tyr	Ser	Val	Ile	Leu	Leu	
				245						250					255		
40	Asp	Thr	Leu	Leu	Gly	Arg	Met	Leu	Pro	Gln	Leu	Val	Cys	Arg	Leu	Val	
				260					265					270			
	Leu	Arg	Cys	Ser	Met	Asp	Asp	Ser	Ala	Gly	Pro	Arg	Ser	Pro	Thr	Gly	
45			275					280					285				
	Glu	Trp	Leu	Pro	Arg	Asp	Ser	Glu	Cys	His	Leu	Cys	Met	Ser	Val	Thr	
	290						295					300					
50	Thr	Gln	Ala	Gly	Asn	Ser	Ser	Glu	Gln	Ala	Ile	Pro	Gln	Ala	Met	Leu	
	305				310						315					320	
	Gln	Ala	Cys	Val	Gly	Ser	Trp	Leu	Asp	Arg	Glu	Lys	Cys	Lys	Gln	Phe	
				325						330					335		
55	Val	Glu	Gln	His	Thr	Pro	Gln	Leu	Leu	Thr	Leu	Val	Pro	Arg	Gly	Trp	
				340				345						350			

Asp Ala His Thr Thr Cys Gln Ala Leu Gly Val Cys Gly Thr Met Ser
 355 360 365
 Ser Pro Leu Gln Cys Ile His Ser Pro Asp Leu
 5 370 375

 <210> 27
 10 <211> 527
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 27
 15 Met Tyr Ala Leu Phe Leu Leu Ala Ser Leu Leu Gly Ala Ala Leu Ala
 1 5 10 15
 Gly Pro Val Leu Gly Leu Lys Glu Cys Thr Arg Gly Ser Ala Val Trp
 20 25 30
 20 Cys Gln Asn Val Lys Thr Ala Ser Asp Cys Gly Ala Val Lys His Cys
 35 40 45
 Leu Gln Thr Val Trp Asn Lys Pro Thr Val Lys Ser Leu Pro Cys Asp
 25 50 55 60
 Ile Cys Lys Asp Val Val Thr Ala Ala Gly Asp Met Leu Lys Asp Asn
 65 70 75 80
 30 Ala Thr Glu Glu Glu Ile Leu Val Tyr Leu Glu Lys Thr Cys Asp Trp
 85 90 95
 Leu Pro Lys Pro Asn Met Ser Ala Ser Cys Lys Glu Ile Val Asp Ser
 100 105 110
 35 Tyr Leu Pro Val Ile Leu Asp Ile Ile Lys Gly Glu Met Ser Arg Pro
 115 120 125
 Gly Glu Val Cys Ser Ala Leu Asn Leu Cys Glu Ser Leu Gln Lys His
 40 130 135 140
 Leu Ala Glu Leu Asn His Gln Lys Gln Leu Glu Ser Asn Lys Ile Pro
 145 150 155 160
 45 Glu Leu Asp Met Thr Glu Val Val Ala Pro Phe Met Ala Asn Ile Pro
 165 170 175
 Leu Leu Leu Tyr Pro Gln Asp Gly Pro Arg Ser Lys Pro Gln Pro Lys
 180 185 190
 50 Asp Asn Gly Asp Val Cys Gln Asp Cys Ile Gln Met Val Thr Asp Ile
 195 200 205
 Gln Thr Ala Val Arg Thr Asn Ser Thr Phe Val Gln Ala Leu Val Glu
 55 210 215 220
 His Val Lys Glu Glu Cys Asp Arg Leu Gly Pro Gly Met Ala Asp Ile
 225 230 235 240

Cys Lys Asn Tyr Ile Ser Gln Tyr Ser Glu Ile Ala Ile Gln Met Met
 245 250 255
 5 Met His Met Gln Asp Gln Gln Pro Lys Glu Ile Cys Ala Leu Val Gly
 260 265 270
 Phe Cys Asp Glu Val Lys Glu Met Pro Met Gln Thr Leu Val Pro Ala
 275 280 285
 10 Lys Val Ala Ser Lys Asn Val Ile Pro Ala Leu Glu Leu Val Glu Pro
 290 295 300
 Ile Lys Lys His Glu Val Pro Ala Lys Ser Asp Val Tyr Cys Glu Val
 15 305 310 315 320
 Cys Glu Phe Leu Val Lys Glu Val Thr Lys Leu Ile Asp Asn Asn Lys
 325 330 335
 20 Thr Glu Lys Glu Ile Leu Asp Ala Phe Asp Lys Met Cys Ser Lys Leu
 340 345 350
 Pro Lys Ser Leu Ser Glu Glu Cys Gln Glu Val Val Asp Thr Tyr Gly
 355 360 365
 25 Ser Ser Ile Leu Ser Ile Leu Leu Glu Glu Val Ser Pro Glu Leu Val
 370 375 380
 Cys Ser Met Leu His Leu Cys Ser Gly Thr Arg Leu Pro Ala Leu Thr
 30 385 390 395 400
 Val His Val Thr Gln Pro Lys Asp Gly Gly Phe Cys Glu Val Cys Lys
 405 410 415
 35 Lys Leu Val Gly Tyr Leu Asp Arg Asn Leu Glu Lys Asn Ser Thr Lys
 420 425 430
 Gln Glu Ile Leu Ala Ala Leu Glu Lys Gly Cys Ser Phe Leu Pro Asp
 435 440 445
 40 Pro Tyr Gln Lys Gln Cys Asp Gln Phe Val Ala Glu Tyr Glu Pro Val
 450 455 460
 Leu Ile Glu Ile Leu Val Glu Val Met Asp Pro Ser Phe Val Cys Leu
 45 465 470 475 480
 Lys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Ala His Lys Pro Leu Leu Gly Thr Glu
 485 490 495
 50 Lys Cys Ile Trp Gly Pro Ser Tyr Trp Cys Gln Asn Thr Glu Thr Ala
 500 505 510
 Ala Gln Cys Asn Ala Val Glu His Cys Lys Arg His Val Trp Asn
 515 520 525
 55

<210> 28

<211> 523

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5 <400> 28

Met Tyr Ala Leu Phe Leu Leu Ala Ser Leu Leu Gly Ala Ala Leu Ala
 1 5 10 15

10 Gly Pro Val Leu Gly Leu Lys Glu Cys Thr Arg Gly Ser Ala Val Trp
 20 25 30

Cys Gln Asn Val Lys Thr Ala Ser Asp Cys Gly Ala Val Lys His Cys
 35 40 45

15 Leu Gln Thr Val Trp Asn Lys Pro Thr Val Lys Ser Leu Pro Cys Asp
 50 55 60

Ile Cys Lys Asp Val Val Thr Ala Ala Gly Asp Met Leu Lys Asp Asn
 65 70 75 80

20 Ala Thr Glu Glu Glu Ile Leu Val Tyr Leu Glu Lys Thr Cys Asp Trp
 85 90 95

25 Leu Pro Lys Pro Asn Met Ser Ala Ser Cys Lys Glu Ile Val Asp Ser
 100 105 110

Tyr Leu Pro Val Ile Leu Asp Ile Ile Lys Gly Glu Met Ser Arg Pro
 115 120 125

30 Gly Glu Val Cys Ser Ala Leu Leu Cys Glu Ser Leu Gln Lys His Leu
 130 135 140

Ala Glu Leu Asn His Gln Lys Gln Leu Glu Ser Asn Lys Ile Pro Glu
 145 150 155 160

35 Leu Asp Met Thr Glu Val Val Ala Pro Phe Met Ala Asn Ile Pro Leu
 165 170 175

40 Leu Leu Tyr Pro Gln Asp Gly Pro Arg Ser Lys Pro Gln Pro Lys Asp
 180 185 190

Asn Gly Asp Val Cys Gln Asp Cys Ile Gln Met Val Thr Asp Ile Gln
 195 200 205

45 Thr Ala Val Arg Thr Asn Ser Thr Phe Val Gln Ala Leu Val Glu His
 210 215 220

Val Lys Glu Glu Cys Asp Arg Leu Gly Pro Gly Met Ala Asp Ile Cys
 225 230 235 240

50 Lys Asn Tyr Ile Ser Gln Tyr Ser Glu Ile Ala Ile Gln Met Met Met
 245 250 255

55 His Met Gln Pro Lys Glu Ile Cys Ala Leu Val Gly Phe Cys Asp Glu
 260 265 270

Val Lys Glu Met Pro Met Gln Thr Leu Val Pro Ala Lys Val Ala Ser
 275 280 285

Lys Asn Val Ile Pro Ala Leu Glu Leu Val Glu Pro Ile Lys Lys His
 290 295 300
 5 Glu Val Pro Ala Lys Ser Asp Val Tyr Cys Glu Val Cys Glu Phe Leu
 305 310 315 320
 Val Lys Glu Val Thr Lys Leu Ile Asp Asn Asn Lys Thr Glu Lys Glu
 325 330 335
 10 Ile Leu Asp Ala Phe Asp Lys Met Cys Ser Lys Leu Pro Lys Ser Leu
 340 345 350
 Ser Glu Glu Cys Gln Glu Val Val Asp Thr Tyr Gly Ser Ser Ile Leu
 355 360 365
 15 Ser Ile Leu Leu Glu Glu Val Ser Pro Glu Leu Val Cys Ser Met Leu
 370 375 380
 His Leu Cys Ser Gly Thr Arg Leu Pro Ala Leu Thr Val His Val Thr
 385 390 395 400
 Gln Pro Lys Asp Gly Gly Phe Cys Glu Val Cys Lys Lys Leu Val Gly
 405 410 415
 25 Tyr Leu Asp Arg Asn Leu Glu Lys Asn Ser Thr Lys Gln Glu Ile Leu
 420 425 430
 Ala Ala Leu Glu Lys Gly Cys Ser Phe Leu Pro Asp Pro Tyr Gln Lys
 435 440 445
 30 Gln Cys Asp Gln Phe Val Ala Glu Tyr Glu Pro Val Leu Ile Glu Ile
 450 455 460
 Leu Val Glu Val Met Asp Pro Ser Phe Val Cys Leu Lys Ile Gly Ala
 465 470 475 480
 Cys Pro Ser Ala His Lys Pro Leu Leu Gly Thr Glu Lys Cys Ile Trp
 485 490 495
 40 Gly Pro Ser Tyr Trp Cys Gln Asn Thr Glu Thr Ala Ala Gln Cys Asn
 500 505 510
 Ala Val Glu His Cys Lys Arg His Val Trp Asn
 515 520
 45
 <210> 29
 50 <211> 380
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 29
 55 Met Ala Glu Ser His Leu Leu Gln Trp Leu Leu Leu Leu Leu Pro Thr
 1 5 10 15
 Leu Cys Gly Pro Gly Thr Ala Ala Trp Thr Thr Ser Ser Leu Ala Cys

	20	25	30
	Ala Gln Gly Pro Glu Phe Trp Cys Gln Ser Leu Glu Gln Ala Leu Gln		
	35	40	45
5	Cys Arg Ala Leu Gly His Cys Leu Gln Glu Val Trp Gly His Val Gly		
	50	55	60
10	Ala Asp Asp Leu Cys Gln Glu Cys Glu Asp Ile Val His Ile Leu Asn		
	65	70	75
	Lys Met Ala Lys Glu Ala Ile Phe Gln Asp Thr Met Arg Lys Phe Leu		
	85	90	95
15	Glu Gln Glu Cys Asn Val Leu Pro Leu Lys Leu Leu Met Pro Gln Cys		
	100	105	110
	Asn Gln Val Leu Asp Asp Tyr Phe Pro Leu Val Ile Asp Tyr Phe Gln		
	115	120	125
20	Asn Gln Thr Asp Ser Asn Gly Ile Cys Met His Gly Leu Cys Lys Ser		
	130	135	140
	Arg Gln Pro Glu Pro Glu Gln Glu Pro Gly Met Ser Asp Pro Leu Pro		
25	145	150	155
	Lys Pro Leu Arg Asp Pro Leu Pro Asp Pro Leu Leu Asp Lys Leu Val		
	165	170	175
30	Leu Pro Val Leu Pro Gly Ala Leu Gln Ala Arg Pro Gly Pro His Thr		
	180	185	190
	Gln Asp Leu Ser Glu Gln Gln Phe Pro Ile Pro Leu Pro Tyr Cys Trp		
	195	200	205
35	Leu Cys Arg Ala Leu Ile Lys Arg Ile Gln Ala Met Ile Pro Lys Gly		
	210	215	220
	Ala Leu Ala Val Ala Val Ala Gln Val Cys Arg Val Val Pro Leu Val		
40	225	230	235
	Ala Gly Gly Ile Cys Gln Cys Leu Ala Glu Arg Tyr Ser Val Ile Leu		
	245	250	255
45	Leu Asp Thr Leu Leu Gly Arg Met Leu Pro Gln Leu Val Cys Arg Leu		
	260	265	270
	Val Leu Arg Cys Ser Met Asp Asp Ser Ala Gly Pro Arg Ser Pro Thr		
	275	280	285
50	Gly Glu Trp Leu Pro Arg Asp Ser Glu Cys His Leu Cys Met Ser Val		
	290	295	300
	Thr Thr Gln Ala Gly Asn Ser Ser Glu Gln Ala Ile Pro Gln Ala Met		
55	305	310	315
	Leu Gln Ala Cys Val Gly Ser Trp Leu Asp Arg Glu Lys Cys Lys Gln		
	325	330	335

Phe Val Glu Gln His Thr Pro Gln Leu Leu Thr Leu Val Pro Arg Gly
 340 345 350

5 Trp Asp Ala His Thr Thr Cys Gln Ala Leu Gly Val Cys Gly Thr Met
 355 360 365

Ser Ser Pro Leu Gln Cys Ile His Ser Pro Asp Leu
 370 375 380

10

<210> 30
 <211> 4124
 15 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 30

20 atgagagaat ggggttctgct catgtccgtg ctgctctgtg gcctggctgg cccacacac 60
 ctgttccagc caagcctggg gctggacatg gccaaaggtcc tcttggataa ctactgcttc 120
 ccggagaacc tgctgggcat gcaggaagcc atccagcagg ccatcaagag ccatgagatt 180
 ctgagcatct cagaccgca gacgtggcc agtgtgctga cagccgggg gcagagctcc 240
 ctgaacgac ctcgcctggg catctcctat gagcccagca ccccgagcc tccccacaa 300
 gtcccagcac tcaccagcct ctcaagaagag gaactgcttg cctggctgca aaggggctc 360
 25 cgccatgagg ttctggagg taatgtggg tacctgcggg tggacagcgt cccgggcccag 420
 gaggtgctga gcatgatggg ggagttcctg gtggcccacg tgtgggggaa tctcatggg 480
 acctccgct tagtgctgga tctccggcac tgcacaggag gccagggtctc tggcattccc 540
 tacatcatct cctacctgca cccagggaac accatcctgc acgtggacac tatctacaac 600
 cgccctcca acaccaccac ggagatctgg acctggccc aggtcctggg agaaaggtac 660
 30 ggtgccgaca aggatgtggg ggtcctcacc agcagccaga ccaggggct ggccgaggac 720
 atcgcgaca tccttaagca gatgcgcagg gccatcgtgg tgggagagcg gactggggga 780
 ggggcccctg acctccggaa gctgaggata ggcgagtctg acttcttctt cacgggtgcc 840
 gtgtccaggc cctggggccc ccttggtgga ggcagccaga cgtgggaggg cagcggggtg 900
 ctgccctgtg tggggactcc ggccgagcag gccctggaga aagccctggc catcctcact 960
 35 ctgcgagcg ccttccagg ggtagtcac tgcctccagg aggtcctgaa ggactactac 1020
 acgctggtgg acctgtgcc caccctgtg cagcacttg ccagcatgga cttctccag 1080
 gtggtctccg aggaagatct ggtcaccaag ctcaatgccg gcctgcaggc tgcgtctgag 1140
 gatccaggc tcctggtgag agccatcggg cccacagaaa ctcttcttg gcccgcccc 1200
 gacgtgcag ccgaagactc accaggggtg gcccagagt tgcctgagga cgaggctatc 1260
 40 cggcaagcac tgggtgactc tgtgttccag gtgtcggtgc tgccaggcaa tgtgggtac 1320
 ctgcgcttcg atagttttgc tgacgctcc gtcctgggtg tgttgcccc atatgtcctg 1380
 cgccagggtg gggagccgct acaggacacg gagcacctca tcatggacct gcgccacaac 1440
 cctggagggc catcctctgc tgtgccctg ctctgtcct acttccaggg cctgaggcc 1500
 ggccccgtgc acctcttcac cacctatgat cgccgacca acatcacgca ggagcacttc 1560
 45 agccacatgg agctcccggg cccacgctac agcacccaac gtggggtgta tctgctcacc 1620
 agccaccgca ccgccacggc cgcggaggag ttcgccttcc ttatgcagtc gctgggctgg 1680
 gccacactgg taggtgagat caccgcggg aacctgtgc acaccgcac ggtgccgctg 1740
 ctggacacac ccgaaggcag cctcgcgctc accgtgccg tcctcacctt catcgacaat 1800
 cacggcgagg cctggctggg tgggtgagtg gtgccgatg ccatcgtgct ggccgaggag 1860
 50 gccctggaca aagcccagga agtctggag ttccacaaa gcctgggggc cttggtggag 1920
 ggcacagggc acctgtgga ggccactat gctcgccag aggtcgtgg gcagaccagt 1980
 gccctcctgc gggccaagct ggcccaggc gcctaccgca cagctgtgga cttggagtct 2040
 ctggcctctc agctcacagc agacctccag gaggtgtctg gggaccaccg cttgctagt 2100
 ttccacagcc ctggcgagct ggtggtagag gaagacccc caccacccc tgtgtcccc 2160
 55 tctccagagg agctcaccta ccttattgag gccctgttca agacagagg gctgccggc 2220
 cagctgggct acctgcgttt tgacgccatg gctgaactgg agacagtga ggccgtggg 2280
 ccacagctgg tgcggctgg atggaacag ctggtggaca cggctgcgt ggtgatcgac 2340
 ctgcgctaca accctggcag ctactccac gccatccgc tgcctgctc ctactcttt 2400

gaggcagagc cccgccagca cctgtattct gtctttgaca gggccacctc aaaagtcacg 2460
 gaggtgtgga ccttgcccca ggtcgccggc cagcgctacg gctcacacaa ggacctctac 2520
 atcctgatga gccacaccag tggctctgcg gccgaggcct ttgcacacac catgcaggac 2580
 ctgcagcggg ccacggtcac tggggagccc acggccggag gcgcactctc tgtgggcatc 2640
 5 taccaggtgg gcagcagccc cttatatgca tccatgccca cccagatggc catgagtggc 2700
 accacaggca aggcctggga cctggctggt gtggagcccg acatcactgt gcccattgagc 2760
 gaagcccttt ccatagccca ggacatagtg gctctgcgtg ccaaggtgcc cacgggtgctg 2820
 cagacggccg ggaagctggt ggctgataac tatgcctctg ccgagctggg ggccaagatg 2880
 gccacaaaac tgagcggctc gcagagccgc tactccaggg tgacctcaga agtggcccta 2940
 10 gccgagatcc tgggggctga cctgcagatg ctctccggag acccacacct gaaggcagcc 3000
 catatccctg agaatgcaa ggaccgcatt cctggaattg tgcccatgca gatcccttcc 3060
 cctgaagtat ttgaagagct gatcaagttt tccttcaca ctaacgtgct tgaggacaac 3120
 attggctact tgaggtttga catgtttggg gacggtgagc tgctcaccca ggtctccagg 3180
 ctgctggtgg agcacatctg gaagaagatc atgcacacgg atgccatgat catcgacatg 3240
 15 aggttcaaca tcggtggccc cacatcctcc attcccatct tgtgctccta cttctttgat 3300
 gaaggccctc cagttctgct ggacaagatc tacagccggc ctgatgactc tgtcagtga 3360
 ctctggacac acgcccagg ttaggtgaa cgctatggct ccaagaagag catggtcatt 3420
 ctgaccagca gtgtgacggc cggcaccgag gaggagtcca cctatatcat gaagaggctg 3480
 ggccggggccc tggctattgg ggaggtgacc agtgggggct gccagccacc acagacctac 3540
 20 cacgtggatg acaccaacct ctacctcact atccccacgg cccgttctgt gggggcctcg 3600
 gatggcagct cctgggaagg ggtgggggtg acaccccatg tggttgtccc tgcagaagag 3660
 gctctgcaca gggccaagga gatgctccag cacaaccagc tgagggtgaa gcggagccca 3720
 ggccctgcagg accactgta gggaagggcc ccacaggcag agccccaggg cagacagaac 3780
 ctctgggaca cacaccaagg gcaactcctg aggtggcccg gcctgagggt cccaggagca 3840
 25 gcaaagggggc ctgctgagct ctggttaggt tacagctgga ggtgtgtata tatacacaca 3900
 cacacatgta tatacacata tatatgtgta tgtatatata tgtatatata tatggctttc 3960
 caataaccac ctaaatttta acaaagggtc cttctaagtg gtagaacttg ggggtggtatt 4020
 ttacaccttc ttcttcatac tttgtctctt ttcttaataa ctcattaatg tgcataatc 4080
 attattttca gatgcagcta tcattattcc aaaatacaaa ataa 4124
 30
 <210> 31
 <211> 579
 <212> ADN
 35 <213> Homo sapiens
 <400> 31
 atgcarwsny tnatgcargc nccnytnytn athgcnytn gnytnytnyt ngcnacnccn 60
 gncargcnc ayytnaaraa rccnwsncar ytnwsnwsnt tywsntggga yaaytgygay 120
 40 garggnaarg aycngcngt nathmgnwsn ytnacnytn arcngaycc nathgtngtn 180
 ccnggnaayg tnacnytnws ngtngtnggn wsnacnwsn tnccnytnws nwsnccnytn 240
 aargtngayy tngtnytna raargargtn gcnggnytn ggathaarat hccntgyacn 300
 gaytayathg gnwsntgyac nttygaray ttytgygay tnytngayat gytnathccn 360
 acngngarc cntgyccnga rccnytnmgn acntayggny tnccntgyca ytgyccntty 420
 45 aargarggna cntaywsny nccnaarwsn garttygtng tnccngayyt ngarytnccn 480
 wsntggytna cnacnggnaa ytaymgnath garwsngtny tnwsnwsnws nggnaarmgn 540
 ytnngntgya thaarathgc ngcnwsnytn aarggnath 579
 50
 <210> 32
 <211> 633
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 55 <400> 32
 tttctttgcg taaccaatac tgggaaggcat ttaaaggacc tctgccgcct cagaccttgc 60
 agttaactcc gccctgacct acccttcccc atgcagtcct tgatgcagge tccctcctg 120
 atcgccctgg gcttgcttct cgcgacctct gcgcaagccc acctgaaaaa ggtgagtgc 180

cccctctttta agagtctgtt tgcagcctcc tggcccagct acgggtgtgc gggctctggct 240
 gagatatggg ggtggccact ccgttctcta gaattgggtc tctgcactag agccttccaa 300
 agtaactaat tatgggattc tggctctgtac aatgaggggtg gcctctaaag acttgttctg 360
 ctccaggccc tttttggaga gattaatctc acgtctgcac tctcctgccc tccctccaag 420
 5 cgccggagtg aaaatgcaga cagccttaaa actaaggcat tgcccccagg agattcagtc 480
 ctgttaaccc tgcaccttac tcctgacccc cactccttat gtcccccattg ataaggcctg 540
 ctgcctcatc tcttcccctg ctggaatgcc ctgaggtctt cctgagagtt gggaggggtt 600
 gagagctttc caaggccaag aggattcact aag 633

10

<210> 33
 <211> 1047
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

15

<400> 33
 caggagcttg cccctcttget gggattccaa cgctggctgg agaggagtgg gcagcaggga 60
 ggtgggaagt cagagaaggt gccacacaaa ggcctattag gtcagtctcc tgtttggaag 120
 ttccaggctc atcatatcct gccttatagt ttacaataca cttttgggag attatgtctt 180
 20 ttgagctctt tagtttagtc ctgcctataa aatgagtagg ataagtgtta tcccagggtc 240
 ataggatagg agtctcatag atgaggctca gggacggggg tgccctcacc aaggtcacac 300
 tgccaggagc tcatttttcc tgtgatctgt gatagtttct tttgtcaacc ttttcttct 360
 tctccttctt tgctgcctga ttgtcccag ccatcccagc tcagtagctt ttcctgggat 420
 aactgtgatg aagggaagga cctgcggtg atcagaagcc tgactctgga gcctgacccc 480
 25 atcgtcgttc ctggaaatgt gaccctcagt gtcgtgggca gcaccagtgt ccccttagt 540
 tctcctctga aggtgagcct ggggggtggg ggagaagggg aggtgagagg gtctggccag 600
 caggggtact ggggcatgta tgcttgggga actgtgaaga atttcagaat cctggattcc 660
 cagagaatag tacaggacat gtagattcag acactcttcc acaggttcat ggaatctcag 720
 gatcataaga ttgaaaggaa tctctgatgt cagcgccagc aacttcctgg tgagggcagg 780
 30 agtgacggat accctgcacc tggcagaagc gtcctggcct tctctgggcc tgggtggccaa 840
 ctgctcatta ttatctgaca gctctggttg gccaatttgg ttttgctgtt aattataaaa 900
 ttgatatacc aattagccag taatatatag tcactttaga aaacacaagt ggtcaaaaaa 960
 taaataaaat aggccaagtg tggtaacttc atgcctgtaa tccccacacc cttaggaggc 1020
 tgaaggtggg tgggatcctt tttgagg 1047

35

<210> 34
 <211> 1706
 <212> ADN

40

<213> Homo sapiens

<400> 34
 acagtagatg ccagtgcatt tcaatgcaag tgtagagcc aatcaatggg tagtgactac 60
 ctaaagaatt ttaagactat ggattgagca tgatggctca cggcctgtaa tcccagcctt 120
 45 tgggaaggatg aggtgaaagg attgcttgag gccaggagtt ccagaccagc ttgggcaaca 180
 aagttagccc catctctaca aaaaatacaa aattagctgg gtgtggtggc atgtgcctgt 240
 ctgtgtttcc cacctacatg ggaggctgag gcaggaggat cgtctgagcc caggagtttg 300
 aggctgcagt gagtgcagtg agccatgata caaaaaaaaa aaataaagaa ttctaagctc 360
 atgtatagtt cagtgtaggg ggaataatca catttgatta ttaatgtctg ccatgggcac 420
 50 aataatacac tatactcaca catgggccac aatgttgcca ttcctagaac agactatctc 480
 taagatctca tccagttaaa aattctatga ttaaaatata ttgctgcttt tttgaagaca 540
 gaagagctgg tatgtttgcc ctggaattta cacttataac ctttttcaaa cctttgtttt 600
 attttttttt accaggtgga tttagttttg gagaaggagg tggctggcct ctggatcaag 660
 atcccattgca cagactacat tggcagctgt acctttgaac acttctgtga tgtgcttgac 720
 55 atgttaattc ctactgggga gcctgcccc gagccctgc gtacctatgg gcttctctgc 780
 cactgtccct tcaaaagaat aagtacttag ggaggagaga gcgttaccct tgtggctaaa 840
 gagatggggg ttggagagaa gggctcttgc attctccttc tgcagatctg catgtctctg 900
 gatttgtaag ccagtgtgac ctatcaggaa tcacttatct tccgggagcc tcagttatcc 960

atctacgaaa tgggagactt gaacttagat gtgatcttca gggcccttta tccatataat 1020
 ccatgctcta cagtgcctatg gccgtctctc atcttgctcg gctgttttga gaatgggaag 1080
 aggggtggta gttcatggct gcaatcctag cagtggctct agggaaaaga ccccatcagt 1140
 5 aggcctccac tgactggcgg tccactggct tccccgcagg gaacctactc actgccaag 1200
 agcgaattcg ttgtgcctga cctggagctg cccagttggc tcaccaccgg gaactaccgc 1260
 atagagagcg tcctgagcag cagtgggaag cgtctgggct gcatcaagat cgctgcctct 1320
 ctaaagggca tatagcatgg catctgccac agcagaatgg agcgggtgtga ggaagggtccc 1380
 ttttctctcg ttttgtgttt gccaaaggcca aactccact ctctgcccc ctttaatccc 1440
 ctttctacag tgagtccact accctcactg aaaatcattt tgtaccactt acatttttagg 1500
 10 ctgggggcaag cagccctgac ctaagggaga atgagttgga cagttcttga tagcccaggg 1560
 catctgctgg gctgaccacg ttactcatcc ccgttaacat tctctctaaa gagcctcggt 1620
 catttccaaa gcagttaagg aatgggaaca gagtgtttta ggacctgaag aatctttatg 1680
 actctctctc tttctctctt tttttt 1706

15 <210> 35
 <211> 633
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

20 <400> 35
 tttcttttgcg taaccaatac tgggaaggcat tttaaaggacc tctgccgcct cagaccttgc 60
 agttaactcc gccctgacct acccttcccc atgcagtccc tgatgcaggc tccccctctg 120
 atcgccctgg gcttgcttct cgcgacctct gcgcaagccc acctgaaaaa ggtgagtgc 180
 25 cctcttttta agagtctgtt tgacgcctcc tggcccagct acgggtgtgc ggggtctggct 240
 gagatatggg ggtggccact ccgttctcta gaattggttc tctgactag agccttccaa 300
 agtaactaat tatgggattc tgggtctgtac aatgagggtg gcctctaaaag acttgttctg 360
 ctccaggccc tttttggaga gattaatctc acgtctgcac tctctgccc tccctccaaag 420
 cgccggagtg aaaatgcaga cagccttaaa actaaggcat tgcccccaag agattcagtc 480
 30 ctgttaaccc tgcaccttac tctgacccc cactccttat gtcccccatg ataaggcctg 540
 ctgcctcatc tcttcccctg ctgcaatgcc ctgaggtctt cctgagagtt gggagggttt 600
 gagagctttc caaggccaag aggattcact aag 633

35 <210> 36
 <211> 1047
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

40 <400> 36
 caggagcttg ccctcttgcg gggattccaa cgctggctgg agaggagtgg gcagcagggg 60
 ggtgggaagt cagagaagggt gccacccaaa ggctatttag gtcagtctcc tgtttggaag 120
 ttccaggctc atcatatcct gccttatagt ttacaataca cttttgggag attatgtctt 180
 ttgagtcttt tagtttagtc ctgcctataa aatgagtagg ataagtgtta tcccagggtc 240
 45 atagggtatgg agtctcatag atgaggctca gggacggggg tgccctaccc aaggctcacac 300
 tgccaggagc tcatttttcc tgtgatctgt gatagtttct tttgtcaacc tttttcttct 360
 tctccttcc tgcctcctga ttgtccccag ccatcccagc tcagtagctt ttcttgggat 420
 aactgtgatg aagggaagga ccctgcggtg atcagaagcc tgactctgga gcctgacccc 480
 atcgctcgtc ctggaaatgt gaccctcagt gtcgtgggca gcaccagtgt cccctgagt 540
 50 tctcctctga aggtgagcct ggggggtggg ggagaagggg aggtgagagg gtctggccag 600
 caggggtact ggggcatgta tgcttgggga actgtgaaga atttcagaat cctggattcc 660
 cagagaatag tacaggacat gtgattcag acactcttc acaggttcag ggaatctcag 720
 gatcataaga ttgaaaggaa tctctgatgt cagcgcacgc aacttcctgg tgagggcagg 780
 agtgacggat acctgacac tggcagaagc gtcttggcct tctctgggccc tgggtggccaa 840
 55 ctgctcatta ttatctgaca gctctggttg gccaatgttg ttttgcgtgt aattataaaa 900
 ttgatatacc aattagccag taatatatag tcactttaga aaacacaagt ggtcaaaaaa 960
 taaataaaat aggccaagtg tggtaacttc atgcctgtaa ttcccacacc cttaggaggc 1020
 tgaagggtggg tgggacccct tttgagg 1047

<210> 37
 <211> 1706
 5 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 37
 10 acagtagatg ccagtgcatt tcaatgcaag tgttagagcc aatcaatggg tagtgactac 60
 ctaaagaatt ttaagactat ggattgagca tgatggctca cggcctgtaa tcccagcctt 120
 tgggaaggatg aggtgaaagg attgcttgag gccaggagtt ccagaccagc ttgggcaaca 180
 aagttagagcc catctctaca aaaaatacaa aattagctgg gtgtgggtggc atgtgcctgt 240
 ctgtgtttcc cacctacatg ggaggctgag gcaggaggat cgtctgagcc caggagtttg 300
 aggtgcagtg gagtgcagtg agccatgata caaaaaaaaa aaataaagaa ttctaagtct 360
 15 atgtatagtt cagtgtaggg ggaaaattca catttgatta ttaatgtctg ccatggggcac 420
 aataatacac tatactcaca catggggccac aatgttgcca ttcctagaac agactatctc 480
 taagatctca tccagttaaa aattctatga ttaaaatata ttgctgcttt tttgaagaca 540
 gaagagctgg tatgtttgcc ctggaattta cacttataac ctttttcaaa cttttgtttt 600
 attttttttt accagggtgga tttagttttg gagaaggagg tggctggcct ctggatcaag 660
 20 atcccatgca cagactacat tggcagctgt acctttgaac acttctgtga tgtgcttgac 720
 atgttaattc ctactgggga gccctgcccga gagcccctgc gtacctatgg gcttccttgc 780
 cactgtccct tcaaagaagt aagtacttag ggaggagaga gcgttacccc tgtgggctaaa 840
 gagatgggggt ttggagagaa gggctcttgc attctccttc tgcagatctg catgtctctg 900
 gattttgtaag ccagtgtgac ctatcaggaa tcacttatct tccgggagcc tcagttatcc 960
 25 atctacgaaa tgggagactt gaacttagat gtgactttca gggcccttta tccatataat 1020
 ccatgctcta cagtgtctatg gccgtctctc atcttgtgcg gctgttttga gaatgggaag 1080
 aggggtggta gttcatggct gcaatcctag cagtggctct aggagaaaga ccccatcagt 1140
 aggtccccc tgactggcgg tccactggct tccccgcagg gaacctactc actgcccagg 1200
 agcgaattcg ttgtgcctga cctggagctg cccagttggc tcaccaccgg gaactaccgc 1260
 30 atagagagcg tctgagcag cagtgggaag cgtctgggct gcatcaagat cgctgcctct 1320
 ctaaagggca tatagcatgg catctgccac agcagaatgg agcgggtgtga ggaaggtccc 1380
 ttttctctg ttttgtgttt gccaaaggcca aactcccact ctctgcccc ctttaatccc 1440
 ctttctacag tgagtccact accctcactg aaaaatcattt tgtaccactt acattttagg 1500
 ctggggcaag cagccctgac ctaagggaga atgagttgga cagtctctga tagcccaggg 1560
 35 catctgctgg gctgaccacg ttactcatcc ccgttaacat tctctctaaa gagcctcggt 1620
 catttccaaa gcagttaagg aatgggaaca gagtgtttta ggacctgaag aatctttatg 1680
 actctctctc tttctctctt tttttt 1706

40 <210> 38
 <211> 1043
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

45 <400> 38
 tttctttgctg taaccaatac tggaaggcat ttaaaggacc tctgccgct cagaccttgc 60
 agttaactcc gccctgaccc acccttcccg atgcagtccc tgatgcaggc tcccctcctg 120
 atcgccctgg gcttgettct cgcgaccctc gcgcaagccc acctgaaaaa gccatcccag 180
 ctgagtagct tttcctggga taactgtgat gaagggaagg acctgcgggt gatcagaagc 240
 50 ctgactctgg agcctgaccc catcgtcgtt cctggaaatg tgacctcag tgcgtgggc 300
 agcaccagtg tccccctgag ttctcctctg aagggtgatt tagttttgga gaaggaggtg 360
 gctggcctct ggatcaagat cccatgcaca gactacattg gcagctgtac ctttgaacac 420
 ttctgtgatg tgcttgacat gttaattcct actggggagc cctgcccaga gccctgcgt 480
 acctatgggc ttccttgcca ctgtcccttc aaagaaggaa cctactcact gcccagagc 540
 55 gaattcggtg tgcctgacct ggagctgccc agttggctca ccaccgggaa ctaccgcata 600
 gagagcgtcc tgagcagcag tgggaagcgt ctgggctgca tcaagatcgc tgctctcta 660
 aagggcataat agcatggcat ctgccacagc agaatggagc ggtgtgagga aggtcccttt 720
 tcctctgttt tgtgtttgcc aaggccaaac tcccactctc tgccccctt taatccccct 780

tctacagtga gtccactacc ctccactgaaa atcattttgt accactttaca ttttaggctg 840
 gggcaagcag ccctgacctta agggagaatg agttggacag ttcttgatag cccagggcat 900
 ctgctgggct gaccacgtta ctcatccccg ttaacattct ctctaaagag cctcgttcat 960
 ttccaaagca gttaaggaat gggaacagag tggttttagga cctgaagaat ctttatgact 1020
 5 ctctctcttt ctctcttttt ttt 1043

<210> 39
 <211> 1047
 10 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 39
 15 caggagcttg ccctcttgct gggattccaa cgctggcttg agaggagtgg gcagcaggga 60
 ggtgggaagt cagagaaggt gcccacccaaa ggccatttag gtcagtctcc tggttggaag 120
 ttccaggtct atcatatcct gccttatagt ttacaatata cttttgggag attatgtctt 180
 ttgagtcttt tagtttagtc ctgcctataa aatgagtagg ataagtgtta tcccaggttc 240
 ataggtatgg agtctcatag atgaggctca gggacggggg tgcctcacc aaggtcacac 300
 tgccaggagc tcatttttcc tgtgatctgt gatagtttct tttgtcaacc tttttcttct 360
 20 tctcttctct tgctgcctga ttgtccccag ccattcccagc tcagtagctt ttcctgggat 420
 aactgtgatg aagggaagga ccctgcggtg atcagaagcc tgactctgga gcctgacccc 480
 atcgtcgttc ctggaaatgt gacctcagt gtcgtgggca gcaccagtgt cccctgagt 540
 tctctcttga aggtgagcct ggggggtggg ggagaagggg aggtgagagg gtcctggccag 600
 caggggtact ggggcatgta tgcttgggga actgtgaaga atttcagaat cctggattcc 660
 25 cagagaatag tacaggacat gtagattcag acactcttc acaggttcat ggaatctcag 720
 gatcataaga ttgaaaggaa tctctgatgt cagcgccagc aacttctgg tgagggcagg 780
 agtgacggat accttgacac tggcagaagc gtcctggcct tctctgggcc tgggtggccaa 840
 ctgctcatta ttatctgaca gctctggttg gccaatttgg ttttgctgtt aattataaaa 900
 ttgatatacc aattagccag taatatatag tcacttttag aaacacaagt ggtcaaaaaa 960
 30 taaataaaat aggccaaagt tggttaacttc atgcctgtaa ttccacacac cttaggaggc 1020
 tgaaggtggg tgggacctt tttgagg 1047

<210> 40
 35 <211> 1705
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 40
 40 acagtagatg ccagtgattt caatgcaagt gttagagcca atcaatgggt agtgactacc 60
 taaagaattt taagactatg gattgagcat gatggctcac ggctgtaat cccagccttt 120
 ggaagggtgaa ggtgaaagga ttgcttgagg ccaggagtcc cagaccagct tgggcaacaa 180
 agtgagcccc atctctacaa aaaatacaaa attagctggg tgtggtggca tgtgctgtc 240
 tgtgtttccc acctacatgg gaggtgagg caggaggatc gtctgagccc aggagttaga 300
 45 ggctgcagtg agtgcagtg gccatgatac aaaaaaaaaa aataaagaat tctaagtcta 360
 tgtatagttc agtgtagggg gaaaattcac atttgattat taatgtctgc catgggcaca 420
 ataatacact atactcacac atgggcccaca atgttgccat tcctagaaca gactatctct 480
 aagatctcat ccagttaaaa attctatgat taaaatatat tgctgctttt ttgaagacag 540
 aagagctggg atgtttgccc tggaaattac acttataacc tttttcaaac ctttgtttta 600
 50 ttttttttta ccagggtggat ttagtttttg agaaggagggt ggctggcctc tggatcaaga 660
 tcccatgcac agactacatt ggcagctgta cctttgaaca cttctgtgat gtgcttgaca 720
 tgtaattcc tactggggag ccctgccag agccctgag tacctatggg ctccctggcc 780
 actgtccctt caaagaagta agtacttagg gagagagag cgttaccctc gtggctaagg 840
 agatgggggt tggagagaag ggtctttgca ttctcttct gcagatctgc atgtctctgg 900
 55 atttgtaagc cagtgtgacc tatcaggaat cacttatctt ccgggagcct cagttatcca 960
 tctacgaaat gggagacttg aacttagatg tgatcttcag ggccctttat ccatataatc 1020
 catgctctac agtgctatgg ccgtctctca tcttgctgag ctgttttagg aatgggaaga 1080
 ggggtggtag ttcattggct caatcctagc agtggctcta ggagaaagac cccatcagta 1140

```

ggctcccact gactggcggt ccactggcctt tcccgcaggg aacctactca ctgcccaga 1200
gcgaattcgt tgtgcctgac ctggagctgc ccagttggct caccaccggg aactaccgca 1260
tagagagcgt cctgagcagc agtgggaagc gtctgggctg catcaagatc gctgcctctc 1320
taaagggcat atagcatggc atctgccaca gcagaatgga gcggtgtgag gaaggtccct 1380
5 tttcctctgt tttgtgtttg ccaaggccaa actcccactc tctgcccccc tttaatcccc 1440
tttctacagt gagtccacta ccctcactga aaatcatttt gtaccactta catttttagg 1500
tggggcaagc agccctgacc taaggagaa tgagttggac agttcttgat agcccagggc 1560
atctgctggg ctgaccacgt tactcatccc cgtaaactt ctctctaaag agcctcgctc 1620
atctccaaag cagttaagga atgggaacag agtggttttag gacctgaaga atctttatga 1680
10 ctctctctct tctctctctt ttttt 1705

```

```

<210> 41
<211> 1043
15 <212> ADN
    <213> Homo sapiens

```

```

<400> 41
tttctttgcg taaccaatac tggaaggcat ttaaaggacc tctgccgcct cagaccttgc 60
20 agttaactcc gccctgaccc acccttcccc atgcagtcct tgatgcaggg tcccctcctg 120
atcgccctgg gcttgcttct cgcgacccct gcgcaagccc acctgaaaaa gccatcccag 180
ctcagtagct tttcctggga taactgtgat gaagggaagg accctgcggg gatcagaagc 240
ctgactctgg agcctgaccc catcgtcgtt cctggaaatg tgacctcag tgcgtgggc 300
agcaccagtg tccccctgag ttctcctctg aaggtggatt tagttttgga gaaggagggtg 360
25 gctggcctct ggatcaagat cccatgcaca gactacattg gcagctgtac ctttgaacac 420
ttctgtgatg tgcttgacat gttaattcct actggggagc cctgcccaga gccctgcgt 480
acctatgggc ttccttgcca ctgtcccttc aaagaaggaa cctactcact gcccagagc 540
gaattcgttg tgctgacct ggagctgccc agttggctca ccaccgggaa ctaccgcata 600
gagagcgtcc tgagcagcag tggaagcgt ctgggctgca tcaagatcgc tgccctctca 660
30 aagggcatat agcatggcat ctgccacagc agaatggagc ggtgtgagga aggtcccttt 720
tcctctgttt tgtgtttgcc aaggccaaac tcccactctc tgccccctt taatccccct 780
tctacagtga gtccactacc ctactgaaa atcattttgt accacttaca ttttaggctg 840
gggcaagcag ccctgaccta agggagaatg agttggacag ttcttgatag cccagggcct 900
ctgctgggct gaccacgtta ctcatcccc ttaacattct ctctaaagag cctcggtcat 960
35 ttccaaagca gttaaggaat ggaacagag tgtttttagga cctgaagaat ctttatgact 1020
ctctctcttt ctctcttttt ttt 1043

```

```

<210> 42
40 <211> 342
    <212> ADN
    <213> Homo sapiens

```

```

<400> 42
45 atgacntgya aratgwsnca rytngarmgn aayathgara cnathathaa yacnttycay 60
cartaywsng tnaarytngg ncayccngay acnytnaayc arggngartt yaargarytn 120
gtnmgnarg -ayytncaraa ytttytnaar aargaraaya araaygaraa rgtgnathgar 180
cayathatgg argayytnga yacnaaygcn gayaarcary tnwsnttyga rgarttyath 240
atgytnatgg cnmgnytnac ntggcnwnsn caygaraara tgcaygargg ngaygarggn 300
50 ccnggncayc aycayaarcc nggnytnngn garggnacnc cn 342

```

```

<210> 43
<211> 4195
55 <212> ADN
    <213> Homo sapiens

```

```

<400> 43

```

	ttccaccttt	tggctcttgt	aaataatgct	gctatgaaca	tgaatgtaca	aacatctgtt	60
	tgaatccctg	cattcaattc	ttttgcatat	ataccagga	gcagaatgat	ggatcatatg	120
	gtaattctgt	gtttatttat	ttgaggaaca	aacttgccgt	ttccataac	agctgcacta	180
	ttttacattc	ccactaacag	tgcattaggc	ttccaattct	ctatgcctc	accaacactt	240
5	gttttctggg	ttttaaaaga	agtagtagtc	atccttgtag	gtgtcaggtg	gtatctcatt	300
	gtcgttttgc	ttcatgtttt	cctaaagatt	agtaattttc	atatgcttat	tgaccatttg	360
	tatatcttct	tcggagaagt	gtctatttga	gtctttcccc	aattttgatt	ggtttgtttg	420
	ttttttgttg	ttgagttgta	gggattcttt	tatattctgg	atattaatcc	cttatcagat	480
	atttgtttta	caaataatttt	ctttgtaaca	acagaaacac	accacagtct	tcaaggtttg	540
10	aagccagtta	atctgagtag	cattttgtta	gtggtgggga	gaggatttgt	tcctcctgaa	600
	atcctgggga	attggccacc	tcctcttctc	ctcttaggca	tgaagcgcgt	ctggcttctc	660
	caaagaactc	ttcccctcca	ctacctcaga	gttagcttcc	tctcttcagc	cagtgatcct	720
	ggggtcccg	acacaataat	taaccaagag	agggtgaaa	gctccctgct	gtgtttatgc	780
	aatggctcag	gcccttgtga	agtgccgagg	gaccccaagc	agcctccatc	tcccagggca	840
15	tgggtccatcc	ccagctttca	cagaacagga	aagctgtgga	ggagtgtggg	cagcagggta	900
	ggaatggata	tagcccttgg	caacaacaca	tttcccaca	aagcaccac	ccaaaagaac	960
	aacaacgata	gttttagttt	ttagtaatga	gaacaatagt	tctcatgact	aaaagccatc	1020
	agccaggaca	ctgttctcaa	cccttttgcg	gtctttggac	cctttgaaac	tctgacagaa	1080
	gccatggagg	aatgttctca	ctgagtgcac	gcactcaaaa	tgatgcattc	aacttcaatt	1140
20	cagtttcagg	gatgtatggc	ctgaccacca	atgcagggga	ttagcaatcg	caatagtggga	1200
	gagggcattg	gagtgggaat	ctggctggat	caagcaagtg	gatgccagca	gcccagaaaa	1260
	agagccccc	tacctgcttt	ttccttctcg	ggcactattg	cccagcaaat	gccttctctc	1320
	ttccgcttct	cctacctccc	cacccaaaat	tttcattctg	cacagtgtat	gccacattca	1380
	ctggttgaga	aacagagact	gtagcaactc	tggcagggag	aagctgtctc	tgatggcctg	1440
25	aagctgtggg	cagctggcca	agcctaaccg	ctataaaaag	gagctgcctc	tcagccctgc	1500
	atgtctcttg	tcagctgtct	ttcagaagac	ctggttaagt	ggactgtctg	ggttggcccc	1560
	gcactttggg	cttctcttgg	ggagggtcag	ggaagtggag	cagccttctc	gagagaggag	1620
	agagaaagct	cagggaggtc	tggagcaaa	atactcctgg	aggtggggag	tgaggcaggg	1680
	ataaggaagg	agagtatcct	ccagcacctt	ccagtgggta	agggcacatt	gtctcctagg	1740
30	ctggactttt	cttgagcaga	gggtgggggt	gttaaggaa	tctacggggc	cccgtgtgtg	1800
	tgcacatgtc	tctgtgtgaa	tggaccttcc	ccctccccc	acgtgtatcc	ctatcatccc	1860
	acccttccca	ccagaggcca	tagccatctg	ctggtttggg	tatttgagag	tgcaggccag	1920
	gacaaggcca	tcgcttgggg	catgaatcct	ctgcgtactg	ccctggccag	atgcaaatcc	1980
	cctgccatgg	gattccccag	aaggttctgt	ttttcagggt	gggcaagttc	cgtgggcatc	2040
35	atgttgaccg	agctggagaa	agccttgaac	tctatcatcg	acgtctacca	caagtactcc	2100
	ctgataaagg	ggaatttcca	tgcctgtctc	agggatgacc	tgaagaaatt	gctagagacc	2160
	gagtgtcctc	agtatatcag	ggtgaggagg	ggctgggtgt	ggcgggggct	ctctgcttgg	2220
	tcttggggct	gccctggggc	agcgggtcctc	cctgccaccc	ttcatagatg	ctatgcctcg	2280
	gctctctctg	agatctttaa	actctggctt	cttctctctc	aatcttgaca	gaaaaagggg	2340
40	gcagacgtct	ggttcaaaga	gttgatatac	aacactgatg	gtgcagttaa	cttccaggag	2400
	ttcctcattc	tgggtgataaa	gatgggcgtg	gcagcccaca	aaaaaagcca	tgaagaaagc	2460
	cacaaagagt	agctgagtta	ctgggcccag	aggctggggc	cctggacatg	tacctgcaga	2520
	ataataaagt	catcaatacc	tcatgcctct	ctcttatgct	tttgtggaat	gaggttcctc	2580
	ggtgtggagg	gaggggttga	aaacccaaa	gaagaaaaag	aaatctatgt	tatccacccc	2640
45	tacctctcac	aagcctttcc	tgtcttacc	ctcacctggc	ctctgcccc	cattccttca	2700
	gcccctcatt	tcgagcattg	gatttgaggc	ttaaggattc	aaaaagtcgt	catgaatata	2760
	gctgatgatt	ttatagtggg	tctgaaatgg	gtcggggatt	tgggaacagg	gtggtagtat	2820
	aagaacaact	gatactgttc	tctaagctaa	atcttagctt	ccagctacct	gtcttagatg	2880
	tggctcttgg	gaaccttaga	gtgatagcta	catagaagtg	tgtgggtgtg	tgtgtgtgtg	2940
50	tctgtgtgtg	tgtgtgtgag	agagagacag	acagaaagag	agcaagagag	ggaagggggg	3000
	agaggctgat	tgtgtgtgtg	gtgtgatgta	ggtggacaat	gttcagagtc	ctccattaac	3060
	aggataatcc	tcacacctgt	ccacatacct	cttggttctc	cttggggatt	ttgaaaattt	3120
	ttcctccctc	tccactccca	aactcccaac	tcaattaaat	gataaaggaa	taggcaaaata	3180
	ggaaaaataa	ttagtaaaac	ttaagtcaaa	gaatagggtta	ttcatacgtc	gcctatggga	3240
55	ttctatgctt	tgtgatcaga	aaattatcta	aaaaataact	cccaagggct	ggtacaaggg	3300
	aggccagaag	acgagtgggt	cttctctgag	gtggacatta	aaaaaagaag	aaaatgaagg	3360
	ggaacctttt	gacaagaatg	tcaccccaaa	ctggattttc	atgctgtggg	gtgggggaatt	3420
	ttctgttctc	ctcacttagg	tgttggggca	gtggtgttag	tgatgggtaa	aaaggtagga	3480

agctgtcaca gaatcactaa accaggggttc ttaacttgtc tgtctataca tctctgaaat 3540
 tgggttgaag ttgtgtgcat cattttgagt gacgcactga gaacattcct ccacggcttc 3600
 catcgagagt ctcgaaaagg cccaacacct caaaaagggtt aagaacactt gtctgtctta 3660
 ctggttttta gtaacaaatg gcagagtatt tctctctgtc tctctctctt tttttttttt 3720
 5 tttttttgag acacaggggtc ttgtctgtca cgtggactag agtacaatgg gcatgatcat 3780
 gggctcactg tagcctcgaa cacctgggct caagtaatcc tcccacctca gcctctttag 3840
 tagctgggac tacagcatga gccactgccc ttggctaatt tttaaattat tttttttag 3900
 agatggaaac ttgctatgtt gcccaggcta gtctcaaact cctggactca agcgatcctc 3960
 ctacctgggc ctcccaaagt gctgagatta cagtgtgac cacaccacac ctggccaaag 4020
 10 attggagtat ttttattgct attgttgtgc tgggtgggtg ggtgggtgta tgctttgtgg 4080
 ggacgtgtgt tgttgccaag ggctaaatca gtctctaccc tgctgccac agtcctccac 4140
 agctttcctg ctctgtgaag ctaaggatac accccgatga taagctgtca acata 4195

15 <210> 44
 <211> 477
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

20 <400> 44
 tttttttttt ttttttttgg ataaagactt atttattatt tatcttatca tttcccagaa 60
 caaaggccat tgagtaagcc attcccttta aacttggttg ggcagctgtc acatggctga 120
 cctcttaatt acttcccaca gcctttgcca tgactgtggc catgcccacg tgggtgtgtc 180
 tcatgcagct tctcatgaca ggcaaagatc aactttgcca tcagcatcat acactcctca 240
 25 aagctcagct gattgtcctg gtgtgtgtcc aggtcctcca tgatgtcatt tatgagggct 300
 tcattttctt tctctttctt cataaaagggt tgccaaactg tgcttcccac catttggtct 360
 gaattccttc ttgctcaggg tgtaggggng ggtcttcctt cttaaagtat tgatgaaagg 420
 gggccagatg ggggggttat gctgcgctcc atctgaaaag tggctttggt gggccat 477

30 <210> 45
 <211> 406
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

35 <400> 45
 tttttttttt tttttttttt ttttggagga agagacttta tttggcccca gccctagcc 60
 ccacagccaa gacagtttga cataacaggc cccggggccc tgggtgggta gaggcaggg 120
 ggcctggcct cctgattagt ggctgtggcc gtggccacca tgactgtggc cgtggccggg 180
 40 gccactgtga tcttggccac tgtgggtctta ggggtgccc tcccagaggc ctggcttatg 240
 gtgggtggcca gggccctcgt caccctcgtg cattttttcg tgggagggcc aggttagcct 300
 cgccatcagc atgatgaact cctggagctc agctgcttgt ctgcatttgg gtccaggtcc 360
 tccatgatgt gttctatgac cttttcattc ttattctcct tcttga 406

45 <210> 46
 <211> 425
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

50 <400> 46
 ggaggaagag actttatttg gcccagccc ctatccccac agccaagaca gtttgacata 60
 acaggccccc gggcccttgt tgggtaaagg cagggtggcc tggcctcctg attagtggct 120
 gtggcctgtg ccaccatgac tgtggccgtg gccgtggcca ctgtgatctt ggccactgtg 180
 55 gtcttagggg gtgccctccc cgaggcctgg ctatgggtgg tggccagggc cctcgtcacc 240
 ctcgtgcac ttctcgtggg agggccaggt tagcctcgcc atcagcatga tgaactcctc 300
 gaagctcagc tgcttgtctg catttgtgtc caggtectcc atgatgtgt ctatgacctt 360
 ttcattctta ttctccttct tgagaaaatt ttgcagatct tttcgcacca gctcttngaa 420

ttccc 425

<210> 47
 5 <211> 565
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 47
 10 aattcgctcg gctttgacag agtgcaagac gatgacttgc aaaatgtcgc agctggaacg 60
 caacatagag accatcatca acaccttcca ccaatactct gtgaagctgg ggcacccaga 120
 caccctgaac cagggggaat tcaaagagct ggtgcgaaaa gatctgcaaa attttctcaa 180
 gaaggagaat aagaatgaaa aggtcataga acacatcatg gaggacctgg acacaaatgc 240
 agacaagcag ctgagcttcg aggagtcat catgctgatg gcgaggctaa cctgggcctc 300
 15 ccacgagaag atgcacgagg gtgacgaggg ccctggccac caccataagc caggcctcgg 360
 ggagggcacc ccctaagacc acagtggcca agatcacagt ggccacggcc atggccacag 420
 tcatggtggc cacggccaca ggccactaat caggaggcca ggccaccctg cctctacca 480
 accagggccc cggggcctgt tatgtcaaac tgtcttggct gtggggctag gggctggggc 540
 caaataaagt ctcttctccc aagct 565

20

<210> 48
 <211> 430
 <212> ADN
 25 <213> Homo sapiens

<400> 48
 gacttggagg aagagacttt atttggcccc agcccctagc cccacagcca agacagtttg 60
 acataacagg ccccgggggc ctggttgggt agaggcaggg tggcctggcc tcctgattag 120
 30 tggctgtggc cgtggccacc atgactgtgg ccgtggccgt ggccactgtg atcttggcca 180
 ctgtggtcct agggggtgcc ctccccgagg cctggcttat ggtggtggcc agggccctcg 240
 tcaccctcgt gcatcttctc gtgggaggcc caggttagcc tcgccatcag catgatgaac 300
 tcctcgaagc tcagctgctt gtctgcattt gtgtccaggt cctccatgat gtgttctatg 360
 accttttcat tcttattctc cttcttgaga aaattttgca gatcttttctg caccagctct 420
 35 ttgaattccc 430

<210> 49
 <211> 305
 40 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 49
 45 tgacttggag gaaaaaactt tatttggccc cagcccctag cccacagcc aaaacagttt 60
 gacataacag gccccggggc cctggttggg tagaggcagg ggggcctggc ctctgatta 120
 gtggctgtgg ccggggccac catgactgtg gccggggccg gggccactgt gatcttgcca 180
 ctggggtcct agggggtgcc ctccccgagg cctggtttat ggtggtggcc agggcccttg 240
 tcacccttgt gcatttttct gtgggaggcc caggttagcc tcgccatcag catgatgaac 300
 50 tcctc 305

<210> 50
 <211> 452
 <212> ADN
 55 <213> Homo sapiens

<400> 50
 ggaggaagag actttatttg gccccagccc ctagccccac agccaagaca gtttgacata 60

acaggccccg gggccctggt tgggtagagg cagggtggcc tggcctcctg attagtggct 120
 gtggccgtgg ccaccatgac tgtggccgtg gccgtggcca ctgtgatctt ggccactgtg 180
 gtcttagggg gtgcccctccc cgaggcctgg cttatgggtg tggccagggc cctcgtcacc 240
 ctcgtgcatt ttctcgtggg agggccagggt tagcctcgcc atcagcatga tgaactcctc 300
 5 gaagctcagc tgcttgtctg catttgtgtc caggtcctcc atgatgtgtt ctatgacctt 360
 ttcattctta ttctccttct tgagaaaatt ttgcagatct tttcgacca gctctttgaa 420
 tccccctgg ttcaggggtgt ctgggtgccc ca 452

10 <210> 51
 <211> 4439
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

15 <400> 51
 atcactgtgg agtaggggaa gggcactcct ggggtggcaa ggtgggaggt gggccctgtg 60
 tccccacagt gggcagggag gtatgaaaag ggaagctggc cggacaggaa gggccattcc 120
 aagagggtct tgtgcgcagg gctaagccaa gctttctcca taggcaatgg ggagcaactg 180
 gaggttcgta gcaggagaag gacacatcaa gcccaccagg aggctaagta aaaacagttg 240
 20 tctcccaagt tataagttcc tggaaacctt gctgggagca ggatttagaa aaatgatgtc 300
 gagagatgct agaaacatat tcgccctgag gctctctcac tcagactgca agaggaaggt 360
 atcatcagaa ttgcccttaa ccaggaacca gaatagctgg gtcccccttc tgccaagtca 420
 gcaaccagct atgtgacctt gctcaggctcc atctccgggt gtcagtttct tcatctacaa 480
 tgcaagaggg ttgcccacct ctgagaaccc ttctaaccct aaatctcacc ctatgaatct 540
 25 aagaacacaa cccctcgcca tcctaagtat cacagagcca ggcaagcatg ggtgagagct 600
 cagaccatcc ttgttggact aaaaggaagg ggcagactgc catggggggc agccgagagg 660
 gtcaggcccc cataggtcct cagcctgctt caacctcaaa ggggatgggg ggctgagtgg 720
 tgccagagga gcagcaggct cgctcgggga gtaggggcc ttaggataga agggaaatga 780
 actaaacaa cagcttcctg caaaccagtt tcaggccagg gctgggaatt tcacaaaaaa 840
 30 gcagaaggcg ctctgtgaac atttctgcc ccgccccagc ccccttctg gcagcattag 900
 cacactgtct acctgtgaag caatcttccg gagacagggc caaagggcaa gtgccccagt 960
 caggagctgc ctataaatgc cgagcctgca cagctctggc aaacactctg tgtggctcct 1020
 cggctttgggt aagtgaagct ccagcttccc caggcagaag cctgcctgcc gattccttct 1080
 ttcttccctt gacccaactt ccttccaaat cctcctccta gaagccctcc ttggttggcc 1140
 35 ctgacctact taaagcttct ttcacatttt cttaggtcat gttccctgg ggccctcgc 1200
 cctcaaatgc tttgcttttt ggcaactctgt agatattcta aaaaatcatt ttgtacatgt 1260
 gtgtgacagg ccatctccca gttaagttgc agcctgtgct ttctttttat ttgcacttc 1320
 cccactatt tctgtgagt cttagtagga agtgtcaaag aagcttgaca gcattttctt 1380
 ctaagtgtcc caactcttgg ttttccatta cacagacaga gtgcaagacg atgacttgca 1440
 40 aaatgtcgca gctggaacgc aacatagaga ccatcatcaa caccttccac caatactctg 1500
 tgaagctggg gcacccagac accctgaacc agggggaatt caaagagctg gtgcaaaaag 1560
 atctgcaaaa ttttctcaag gtagggtgg actctggcag gtctgaccca gcctcacgc 1620
 agtttgggtt gacaaggag gatgggagta tgggctacag caatcaagg gaagatttga 1680
 gctcctggag cccagcccca agacgcagcg agtgtcctgt tatacagggc aggtgctcac 1740
 45 agttacacag gacgacagg tcaagaaatt gctcaattga acacctgcta ttgtcgggc 1800
 cctgttctgg gcagagggat gtatggtaa atgggagccc actattccat gaggagacac 1860
 acagtaaagt tgttggccaa taaagagcac agataaagcc aaatgccaat aagtgcctgg 1920
 aagaaaatga gatagagtgc gctgtgggca atggggtgg gtggggtgga ggtgaccagt 1980
 tagggtacat gagaagggcc tcttgagga ggtaacattt gagctgagcc ccgaatgtt 2040
 50 gggaggggaag cccctgagga tgacatttg cacaagctg agggagacct aagcctcagg 2100
 gcgaacttgg ggtggaagac ttgggggtct ttctaactct aagggtctgc ggtgaaaaa 2160
 gaatgcataa agagcacatg gagagcacct gcacagcact cagggaactg ggaggtttt 2220
 cccccgctcc aaaaatgatt aggcagttct aagaaaaagg ctgagcactt ccaacagcct 2280
 ttttgttttc ttttcaaatt tggggaaagt cgggaaacag aggcctgcat taagaagggt 2340
 55 ggaacacatg ggtctcagtc tcagttccag tcccggagcc agacatcctg gggtaggtcc 2400
 ccagccctcc cagtgccctt cctccgcct tggttaagggt gagaattgca gccttcagag 2460
 ttaggggccc tgacagctct ccataggtgg aggcctcagg caggcaggat gctgggtggg 2520
 gtaggcaaga aagggccag cagagaggcc gcatcggaat actatcctcc atgtgacccc 2580

ctatgccgcg ttcaccccc accctgacatc ccccaccaga agcaaagcga tgctgtggga 2640
 aaggaagcag agcctcatgg atgggctgca caggagagtg ctgcattgg ctgggtaccc 2700
 cacaggttct gggaggggac ttagcgaggt gactcagtgc ctggcctcc caaagtgtg 2760
 5 ggattacaag catgagccac cctgtccgac catctcccct tttatacttt atcacaccct 2820
 tgaggtcagc ggagcacata ctctgctctc tgaccctcca tctcccctgc ccacacctag 2880
 gtttttctag tgtttccccg ttgtattggg tgaaataagt ttcactaatt ggtaacctcc 2940
 agaggggaagg gaaggaggg caggggaagg agtgaagtgc agaggggtag cagagtggaa 3000
 ctggcctcta agtcagatct gaatttgcac gccctcaata gtcaagcctg tgaaaactaa 3060
 tgaccctctc taggactggg ttcaagtctt cctccaggaa gataccattc ctagtgtta 3120
 10 aagttgttat aaggaccaa tgaggtgaca tttccaggct tactcatgcc atgaccaggg 3180
 caagaccctg gaactcagct tctcttcta taaatagaga atcagcacc aagtcacagg 3240
 gtcattggagg gaataaactg gagagcgttt ggtatgtgct cagtgtctgc tccattgtgc 3300
 gcactcagcc tatggtcatt tttattttt aaatccagcc ccagggtcga ggcttccttg 3360
 15 tacatttccc agctggctat ttactgtgct cccagctccc acctctggcc acaccagct 3420
 ctcacagcct tctctcccca ccgcagaag gagaataaga atgaaaagg catagaacac 3480
 atcatggagg acctggacac aaatgcagac aagcagctga gcttcgagga gttcatcatg 3540
 ctgatggcga ggctaacctg ggctccccc gagaaagtgc acgaggggtga cgagggcct 3600
 ggccaccacc ataagccagg cctcggggag ggcacccct aagaccacag tggccaagat 3660
 cacagtggcc acggccacgg ccacagtcac ggtggccacg gccacaggcc actaatcagg 3720
 20 agggcaggcc accctgcctc taccacaacca gggccccggg gctgttatgt caaactgtct 3780
 tggctgtggg gctaggggct ggggcaaata agtctcttcc tccaagtcag tgctctgtgt 3840
 gcttcttcca cctcttctcc aacctgcct tcccagggt ctggcattta gacagccctg 3900
 tcttatctg tgactcagcc cctcattca gtattaacaa aatgagaagc agcaaacat 3960
 25 gggctctgtg tgggccctt ggctcacctc cctgaccatg tctcacctc tgacttcagg 4020
 cccactgtt cagatcccag gctcctgccc ccattctaga caccctgtcc agcctgtcca 4080
 gcctgacaaa tggcccttgt cactgtacac tgtagaaagc aaaaaggcat atctctaccc 4140
 cttgatatgc ctgctacctc accaaccagc cccaagcctg tcttcaccca tactgtctta 4200
 cacagccctc tctctctcct aacagaattc tattcctctg aaagtcttca gaaactggac 4260
 ctatagatgt ccatgtctgg ggaggaatat ggcaccaggc agtggaaaca aggacagatc 4320
 30 ggtgtgttat ctcacatttg atcagagagc atgatctctc ttaacagacc tgccacccta 4380
 atcaacggga gtgctcacac aagtgggagt ctgagagctt agccctatgc ccaccctgg 4439

<210> 52

35 <211> 565

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 52

40 aattcgctcg gctttgacag agtgcaagac gatgacttgc aaaatgtcgc agctggaacg 60
 caacatagag accatcatca acaccttcca ccaatactct gtgaagctgg ggcacccaga 120
 caccctgaac cagggggaat tcaaagagct ggtgcgaaaa gatctgcaaa attttctcaa 180
 gaaggagaat aagaatgaaa aggtcataga acacatcatg gaggacctgg acacaaatgc 240
 45 agacaagcag ctgagcttcg aggagtcat catgctgatg gcgaggctaa cctgggcctc 300
 ccacgagaag atgcacgagg gtgacgagg ccctggccac caccataagc caggcctcgg 360
 ggagggcacc ccctaagacc acagtggcca agatcacagt ggccacggcc atggccacag 420
 tcatggtggc cacggccaca ggccactaat caggaggcca ggccaccctg cctctaccca 480
 accagggccc cggggcctgt tatgtcaaac tgtcttggt gtggggctag gggctggggc 540
 50 caaataaagt ctcttctccc aagct 565

<210> 53

<211> 255

<212> ADN

55 <213> Homo sapiens

<400> 53

gayaayggng aygtntgyca rgaytgyath caratggttna cngayathca racngcngtn 60

mgnacnaayw snacnttygt ncargcnyn tnrgarcayg tnaargarga rtgygaymgn 120
 ytnngnccng gnatggcnga yathtgyaar aaytayathw sncartayws ngarathgcn 180
 athcaratga tgatgcayat gcargaycar carccnaarg arathtgygc nytnngtnngn 240
 ttytgygayg argtn 255

5

<210> 54
 <211> 2724
 <212> ADN
 10 <213> Homo sapiens

<400> 54
 cgcgctatgt acgcctctct cctcctggcc agcctcctgg gcgcggctct agccggcccg 60
 gtccttggac tgaaagaatg caccaggggc tcggcagtggt ggtgccagaa tgtgaagacg 120
 15 gcgtccgact gcggggcagt gaagcactgc ctgcagaccg tttggaacaa gccaacagtg 180
 aaatcccttc cctgcgacat atgcaaagac gttgtcaccg cagctgggtga tatgctgaag 240
 gacaatgcc a ctgaggagga gatccttggt tacttgagga agacctgtga ctggcttccg 300
 aaaccgaaca tgtctgcttc atgcaaggag atagtggact cctacctccc tgctacctcg 360
 gacatcatta aaggagaaat gagccgtcct ggggaggtgt gctctgctct caacctctgc 420
 20 gagtctctcc agaagcacct agcagagctg aatcaccaga agcagctgga gtccaataag 480
 atcccagagc tggacatgac tgaggtgggt gcccccttca tggccaacat cctctctctc 540
 ctctaccctc aggcagggcc ccgcagcaag cccagccaa aggataatgg ggacgtttgc 600
 caggactgca ttcagatggt gactgacatc cagactgctg tacggaccaa ctccaccttt 660
 gtccaggcct tgggtggaaca tgtcaaggag gagtgtgacc gcctgggccc tggcatggcc 720
 25 gacatatgca agaactatat cagccagtat tctgaaattg ctatccagat gatgatgcac 780
 atgcaaccca aggagatctg tgcgctgggt ggggtctgtg atgaggtgaa agagatgccc 840
 atgcagactc tgggtccccgc caaagtggcc tccaagaatg tcatccctgc cctggaactg 900
 gtggagccca ttaagaagca cgaggtccca gcaaagtctg atgtttactg tgaggtgtgt 960
 gaattcctgg tgaaggaggt gaccaacaa attgacaaca acaagactga gaaagaaata 1020
 30 ctcgacgctt ttgacaaaat gtgctcgaag ctgccgaagt cctgtcggga agagtggcag 1080
 gaggtgggtg acacgtacgg cagctccatc ctgtccatcc tgctggagga ggtcagccct 1140
 gagctgggtg gcagcatgct gcacctctgc tctggcacgc ggctgcctgc actgaccgtt 1200
 cacgtgactc agccaaagga cgggtggcttc tgcgaagtgt gcaagaagct ggtgggttat 1260
 ttggatcgca acctggagaa aaacagcacc aagcaggaga tcctggctgc tcttgagaaa 1320
 35 ggctgcagct tcctgccaga cccttaccag aagcagtggt atcagtttgt ggcagagtac 1380
 agcccgtgc tgatcgagat cctgggtggag gtgatggatc ctctcttctg gtgcttgaaa 1440
 attagagctt gcccctcggc ccataagccc ctggtgggaa ctgagaagtg tatatggggc 1500
 ccaagctact ggtgccagaa cacagagaca gcagccaggt gcaatgctgt cgagcattgc 1560
 aaacgccatg tgtggaacta ggaggaggaa tattccatct tggcagaaac cacagcattg 1620
 40 gtttttttct acttgttgtt ctgggggaat gaacgcacag atctgtttga ctttgttata 1680
 aaaatagggc tccccacact ccccatcttc tgtgtccttt attgtagcat tgctgtctgc 1740
 aaggagagccc ctagcccctg gcagacatag ctgcttcagt gccccttttc tctctgctag 1800
 atggatgttg atgactgga ggtcttttag cctgcccttg catggcgccct gctggaggag 1860
 gagagagctc tgctggcatg agccacagtt tcttgactgg aggccatcaa cctcttggt 1920
 45 tgaggccttg ttctgagccc tgacatgtgc ttgggcaactg gtgggcctgg gcttctgagg 1980
 tggcctcctg ccctgatcag ggacctccc cgctttcctg ggccctctcag ttgaaccaa 2040
 gcagcaaaac aaaggcagtt ttatatgaaa gattagaagc ctggaataat caggcttttt 2100
 aaatgatgta attccactg taatagcata gggatttttg aagcagctgc tgggtggctt 2160
 ggacatcagt ggggccaagg gttctctgtc cctgggtcaa ctgtgatttg gctttcccg 2220
 50 gtctttcctg gtgatgcctt gtttggggtt ctgtgggttt ggggtgggaa agggcccatc 2280
 tgcctgaatg taacctgcta gctctccgaa gccctgcggg cctggcttgt gtgagcgtgt 2340
 ggacagtggt ggcgcgctg tgcctgctg tcttgctac atgtccctgg ctgttgaggc 2400
 gctgcttcag cctgcacccc tccctttgtc tcatagatgc tccttttgac cttttcaaat 2460
 aaatattggat ggcaagctcc taggcctctg cttcctggta gagggcggca tgccgaagg 2520
 55 tctgctgggt gtgattgga tgcctgggtg tgggggttg aagctgtctg tggccactt 2580
 gggcaccac gcttctgtcc acttctggtt gccaggagac agcaagcaa gccagcagga 2640
 catgaagtgt ctattaaatt gacttcgtga tttttgttt gcactaaagt ttctgtgatt 2700
 taacaataaa attctgttag ccag 2724

<210> 55
 <211> 2171
 5 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 55
 10 cgcgctatgt acgccctctt cctcctggcc agcctcctgg gcgcggctct agccggcccc 60
 gtccttggac tgaaagaatg caccaggggc tcggcagtgt ggtgccagaa tgtgaagacg 120
 gcgtccgact gcggggcagt gaagcactgc ctgcagaccg tttggaacaa gccaacagtg 180
 aaatcccttc cctgcgacat atgcaaagac gttgtcaccg cagctggtga tatgctgaag 240
 gacaatgcca ctgaggagga gatccttgtt tacttggaga agacctgtga ctggcttccg 300
 aaaccgaaca tgtctgcttc atgcaaggag atagtggact cctacctccc tgctacctg 360
 15 gacatcatta aaggagaaat gagccgtcct ggggagggtg gctctgctct caacctctgc 420
 gagtctctcc agaagcacct agcagagctg aatcaccaga agcagctgga gtccaataag 480
 atcccagagc tggacatgac tgagggtggtg gcccccttca tggccaacat ccctctctc 540
 ctctaccctc aggacggccc ccgcagcaag cccagccaa aggataatgg ggacgtttgc 600
 caggactgca ttcagatggt gactgacatc cagactgctg tacggaccaaa ctccaccttt 660
 20 gtccaggcct tgggtggaaca tgtcaaggag gagtgtgacc gcctgggccc tggcatggcc 720
 gatcatatga agaactatat cagccagtat tctgaaattg ctatccagat gatgatgac 780
 atgcaaccca aggagatctg tgcgctggtt ggggtctgtg atgagggtga agacctgccc 840
 atgcagactc tgggtccccg caaagtggcc tccaagaatg tcatccctgc cctggaactg 900
 gtggagccca ttaagaagca cgaggtccca gcaaagtctg atgtttactg tgagggtgtg 960
 25 gaattcctgg tgaaggagggt gaccaagctg attgacaaca acaagactga gaaagaaata 1020
 ctgcagcgtt ttgacaaaat gtgctcgaag ctgccgaagt ccctgtcgga agagtgccag 1080
 gaggtggtgg acacgtacgg cagctccatc ctgtccatcc tgctggagga ggtcagccct 1140
 gagctggtgt gcagcatgct gcacctctgc tctggcacgc ggctgcctgc actgaccgtt 1200
 cacgtgactc agccaaagga cgggtggcttc tgcgaagtgt gcaagaagct ggtgggttat 1260
 30 ttggatcgca acctggagaa aaacagcacc aagcaggaga tcctggctgc tcttgagaaa 1320
 ggctgcagct tcctgccaga cccttaccag aagcagtgtg atcagtttgt ggcagagtac 1380
 gagcccgtgc tgatcgagat cctggtggag gtgatggatc ctctctctgt gtgcttgaaa 1440
 attggagcct gcccctcggc ccataagccc ttgttgggaa ctgagaagtg tatatggggc 1500
 ccaagctact ggtgccagaa cacagagaca gcagcccagt gcaatgctgt cgagcattgc 1560
 35 aaatgccatg tgtggaacta ggaggaggaa tattccatct tggcagaaac cacagcattg 1620
 gtttttttct acttgtgtgt ctgggggaat gaacgcacag atctgtttga ctttgttata 1680
 aaaatagggc tccccacct ccccatttc ttgtctctt attgtagcat tgctgtctgc 1740
 aaggaggccc ctagcccctg gcagacatag ctgcttcagt gcccccttct tctctgctag 1800
 atggatgttg atgcactgga ggtcttttag cctgcccttg catggcgctt gctggaggag 1860
 40 gagagagctc tgctggcatg agccacagtt tcttgactgg aggccatcaa ccctcttggg 1920
 tgaggccttg ttctgagccc tgacatgtgc ttgggactg gtgggcctgg gcttctgagg 1980
 tggcctcctg ccctgatcag ggaccctccc cgctttcctg ggcctctcag ttgaacccaa 2040
 gcagcaaaac aaaggcagtt ttatatgaaa gattagaagc ctggaataat caggcttttt 2100
 45 aaatgatgta attcccactg taatagcata gggattttgg aagcagctgc tgggtgcttg 2160
 ggacatcagt g 2171

<210> 56
 <211> 35465
 50 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 56
 55 gatcttggct cactgcaacc tccgcctcca aggttcaagc gatcctccca cctcagcctc 60
 ccaagttagct gggattacaa gcgtgtgcta tcacacctgg ctaattttta tatttttggg 120
 agagatgggg tttcaccttg ttggttaggc tgggtctgaa ctctgacct caggtgatct 180
 gcctgcctca gcctcccaaa gtgctgggat tacagggtgt agccaccgcg cccagcctga 240
 ccctttcttt ctctactggc aaaactcctg ctctttttta aagccaaagt catgtcacct 300

cctctgtgaa gtccctcgctg actccccaag cggtcagtgt ctctctcgta tgggctcccc 360
 ggcccttgca ctgctctcca tcacacctg accactctgg gcagtggccc cctcccccac 420
 ccactgacta tgggctcctt gaaggcaggg cctgggtctg ccccatctct gtgtccccag 480
 caatgctggg catgagtcag cctcagaaga catctgctga atgggtgcaa accagaggaa 540
 5 atctctccag cctcaggctg ggacccctcc cctctctect cccactctg acttcatacc 600
 actcaccctc cagagtcttc aatgcccact attacttcac acagtggcc tgtgacaggc 660
 aatcagggtca tegtccacgg ctaccagggtg tttcatgtct actgtgactt ccaggaccac 720
 aagccctttt ggcgccacca tgtcttcacc taagagatct tcaaagccca gtatgtctct 780
 ggcacccagt ggatcctcca tgccactgc ggatcccaag cctcctgcct ccttgaagtc 840
 10 caccaaatca gcaacaccca acagatcctt agtgcccacc aaaccagcga catcccgtaa 900
 ctcaatcatg agcccaagca gttccaagtc caccaaatcg accagtacaa aaagagcccc 960
 ttctaaccgg cccagcagca ggtcccgagt ccgcagcaaa gcaagaacac ccagcagggt 1020
 gagggcgaca cacagccggg gtaggacacc tggcagaagg ggaagccgca gctccaagag 1140
 15 gtcacccagc agggccagca ctctggcag gataagaact catgggtgcca gaccaggcat 1200
 ggccagcagg gtgagaactc ccacttcaca gcaaaaaggg agccggggaa agagttacgg 1260
 ccggcctaga accagcaaca gggaaaggag tgacagccag cctagaaatc tgagcaagaa 1320
 gagttaccgc ccaccaggag gctcaggtat agggaggagt tccgagctgg ctgtaactcc 1380
 cagtacagcc aagtgtcaaa ccccgactgg aattccctcc aaggagaaga gtgacaacct 1440
 20 atctccatcc tcatcaagga aggtgaagag ctacggtcag atgatcatcc ccagtaggga 1500
 aaagagttac agccccactg aaatgtccag tagggtcaag agttataacc aggcagcac 1560
 ccgcagcagg ccgcaaagtc acagccaatc tagaagcccc agaaggtcaa gaagtggcag 1620
 tcagaagagg acgcacagca gagtgagaag tcacagttgg aagagaaacc atagcagggc 1680
 aagaagtcgc acccggaagg gaattctgag ccagatggga agacacagcc agtctagaag 1740
 25 ccacagcaag gggaaaagtc aaaaccaatc tagaaccctc agaagaggaa gaagtacaaa 1800
 ctgggtctaga aaccccagca aggaaagaag tcatagccat tccagaagct ccagcaaaaga 1860
 gagagatcac aggggatcta gcagccccag gaaggagagt ggtcgcagtc aatcagggaag 1920
 ccccaacaag cagagagatc acagccgatc tagaagtccc aacaaggcga gagatcgag 1980
 ccgatctaga agtccctaca aggcgagaga tcgcagccga tctagaagtc ccaacaaggc 2040
 30 gagagattgc agccgatcta gaagtcccta caaggcgaga gatcgagcc gatctagaag 2100
 tcccaacaag gcaagagatc atagccgatc tagaagtccc aacaaggcga gagatcgag 2160
 ccgatctaga agccccagca aggaaagaga tcacagccaa ctggaagcc ccagcaaaaga 2220
 gagagatcac agacgatcta gaagccccag caaggagaga cagtgcagac aatctagaag 2280
 ctccagcaaa gagagagatc acagacgatc tagaagcccc agcaaggaga gacagcgag 2340
 35 acaatctaga agccccaa caaggagaga tcgcagccaa tctagaagcc ccagcgagga 2400
 gagagagcac agacaatcca gaagccccag caaagagaga gatcgagac gatggagaag 2460
 cccagcaag gagagagagc gcagacaatc tagaagctcc agcgaggaga gagatcacag 2520
 ccgatctaga agccccaa agcagagtgg ttacagtcga cctagagcct ccagcaagga 2580
 gaaagctcat agccgatcta gaacccccag caaagaagga aatcatagcc aatctagaac 2640
 40 ctctagcaag gagagcgacc ccagtcaatc tacagtcccc agaagtcctc actggaagag 2700
 atcccctact aggacaagca gtctcagtca gaatagaacc cctagcaaga caagcagcca 2760
 ctcccataca acatttccca gtgggggcca aacctaaagc caggatgaca gtcaagcca 2820
 cgccaccacc tctaaggcca ccttacctgg ggaaaggtct tcatcatctt cttccaagct 2880
 ggcgtagccc ccagtctcag ctgggtcacg ggtctctgtc atgaccgggg gaggggacag 2940
 45 gagacaggag cagagcagca gctgagcagc gtccctcccc ggccagctct ccacagccac 3000
 acctccggcc acaagtctc taatacagga tgttggcagg tagagaggga tgctggatag 3060
 ggggaaagga aagacctgtg atgattcaat aaatttttac atagcacca tccccaccaa 3120
 gcccaactgt gtgctcactg ctggcatggg gcacagagga cccagctct gtccctgact 3180
 gtctacaggg tcttgactgc aagccctgcc cctctctagg tctttttttt ttttgagaca 3240
 50 gagtctctct ctgttgccca ggctggagtg cagtgggtgt atctcagctc actgcaacct 3300
 ccacctccca ggctcaagca attctcctac ctcagcttcc cgagtagctg gaactacaag 3360
 tgtgcgtect cacgcccggc taattttgta tttttagtag agatggggct tcaccatgtt 3420
 ggccaggctg ggctcgaact cctgacctca ggtgatccac atgcctcaac ctgcgaaagt 3480
 gctgggatta taggcatgag ccaccgcacc cgtccccctc tctaggtctt aatttcgca 3540
 55 tgtgggcaac aaggctgcct tctggttctt attcagtggg gtagggagag gtgacactcc 3600
 aaatattcaa cagtggggac tgggtgtggg accaatcaga actgagagtg gagcgggacg 3660
 gataccaggc cttaaccctt tagttgctgg accatgggga ggtctggggg tggggaagtg 3720
 ttatggggaa aaaaaaccct caaactgtgt ttttctctca ctctcacact atcacaacaa 3780

	tcatacaacac	agaattctgt	gaccaaattgt	gtggggcttt	ttccccacac	actacacagc	3840
	agacaacagc	taggtgtccc	ctccgattcc	attccaacgc	tgtccccaca	cccagctaata	3900
	ttttgtattt	ttggaagaga	caggggtttca	ccatgttgcc	cagagctcaa	gcaatctgcc	3960
	cacttcagcc	ctccaaagtg	ctgggattac	aggcgtgagc	caccacaccc	gactttttta	4020
5	aaaaaataaa	aataaggccg	ggcgcagtga	cccatgcctg	taatcccagc	actttgggag	4080
	gccgaggtgg	gcagatcacc	tgagctcagg	agtttgacac	cagcctaggc	aacatggcaa	4140
	acttgtctct	aaaaaaaaaa	aaaaaattac	aaaagttagc	cgggtgtggtg	gcatgtgctt	4200
	atagtcccag	ctacctgaga	ggctgaggca	ggaggataaa	ttgagcctgg	aagggtcaagg	4260
	ctgcagttag	ccgtgacctt	gccactgcac	tcaagcctgg	atgacccatc	ttacaaaaaa	4320
10	aaaatttttg	ctggagctgc	tcacagaact	caaggaaatg	cttacttaga	tttactgggt	4380
	tattatagag	gatattgcaa	agaacaaaga	tgaagagatg	tgtagggcaa	ggtataaggg	4440
	aaggggcagg	gagcttcacg	ccctccctgg	ggtgctaccc	tacaggaacc	ctcaggtggg	4500
	tagctatgcg	gaagctctcc	aaacccagtc	ctcttggtgt	tttacggagg	ctttaagaca	4560
	gcagcattgg	gcattgactt	ctctgaaaag	tgtcttaaga	ccaacaatca	agaaggtggg	4620
15	gaagattaga	gtcttgccct	ggggcaggaa	tggaggggca	ggaggagggtc	agagagattc	4680
	tgtttcttca	gacctgcccc	aggcctaagg	tacacaacat	tataacaaga	gactgtaaca	4740
	aaggctgtag	gagttaccag	ccaggaactg	tggatgaaaa	ccaatatatt	tatatatata	4800
	ataccacaag	gggggtccaa	agtggcagtt	agggacaggg	agtacttggt	tagcagtgac	4860
	acaccaaccc	atctggaagt	attttaatat	ttaaacaatt	ggtatggcta	tactagtttg	4920
20	tgattctcag	ccttagttct	gtatcaattg	gcaagatagt	gtctagggtt	gccacactct	4980
	agctgtgtag	caccaagcaa	agaacttaac	ttctctagcc	tgtttccctc	tctggaagaa	5040
	aggggcttcc	aggccttaac	tcacgtactc	cccataacta	gactgggaat	tatctccttt	5100
	gtacagatga	ggaaacagac	acagaggtga	taagttagta	gcccagggtc	accatctggt	5160
	aagtggatga	actaggattg	gaagccagac	ctttcataaa	atgatttctc	agctcaaaag	5220
25	gtttttctga	agattcagta	ggctcactga	tagaaattgc	tgggtgtgtg	ctggtattcc	5280
	atcaagagtg	gccattacta	ctcccacccc	tggccctcta	taaactccag	atgttccaga	5340
	cctctcatct	ctccctgtgc	acacaaggcc	ttttcacatc	tgtgggtctt	agtacaccca	5400
	ctgtgtctgt	caagaatgtc	ctcctcctcc	tttttttttt	tttttttgag	atggagtctc	5460
	actttgtgtg	ccaggctgga	gtacagttagc	gcatctctag	ctcactgcaa	cctctaccct	5520
30	gcatcagcct	ccctagtagc	tgggattaca	ggcagccacc	accaccatgc	ccggctaatt	5580
	ttttgggtatt	tttagtagag	acaggggttc	attatgtcag	ccaggctggg	ctcaaaactcc	5640
	tgacctcagg	tgatccattt	accttggtct	cccagagtgc	tgggattaca	ggcaagagcc	5700
	accacgcccc	gccctccttc	cccctttttg	gcctggagaa	ctccttttca	cccttcaaag	5760
	cccaccacaa	acataagaac	ctctataact	cttgcccgt	gaaataactgc	ctctgccagg	5820
35	aagcctctct	tgacttctct	ctcctcctct	tcaccaacgg	accgcccccg	ccccccacca	5880
	accccaccac	acacacacac	cactactgtc	ctccactgta	ctccctgaca	gtagagaaac	5940
	aagcagggcc	agttgatgca	gcctcagcta	tatctcttac	atgccaaagg	ccatgcactg	6000
	gggatacaat	ggtggaaaat	acatgggtccc	ttcaaagtct	ggatgtcaag	tttaatgctg	6060
	gggactaaag	agaaaagctt	cagattgaaa	cctggagggtg	gctggggcaa	aggaccattg	6120
40	gcatcatttg	cagggcaact	tcctaagaga	agcacctaaa	tcttggtctt	taaagacaga	6180
	tttcataatt	ggcagaggag	aattctaatt	ataccctatt	gcctacaggg	ccccatctaa	6240
	tttgggaatt	ctactttata	ccaagataag	attgccagat	ttagcaaata	aaaacagaag	6300
	acatccaatt	aatttttttg	tttgtttttg	ggtttttgtt	gcggagatgg	tgtctcacta	6360
	tgttgccaag	gctgctgtca	aattcctggc	tcaaacaatc	ctcctgcctt	ggcctccac	6420
45	ttcccaaagt	gctgggatta	caggcatgag	ctaccacacc	tggcccttat	ttatttattt	6480
	atttaatttt	cttttttggg	acggagtgtc	actctgtcgc	ccagggtgga	gcgcagtagc	6540
	gcgatctcgg	ctcactgcaa	cctctgcctc	ctgggttcaa	gcgattatcc	tgccccagcc	6600
	tcccaagtag	ctgggactac	aggcgcgtgc	caccatgccc	ggcttttttt	tttttttttt	6660
	tttttttttt	gagacggagt	cttgctctgt	cgcccaggct	ggagtgcagt	ggcacgatct	6720
50	cggtctcactg	caagctccgc	ctcctgggtt	cacgccattc	tcctgcctca	gccttccgag	6780
	tagctgggac	tacaggcgcc	tgccaccacg	ccgcactatt	ttttgtattt	ttagtagaga	6840
	tgggggtttca	ccgtgttagc	caggatgata	tcgatctcct	gacctcgtga	tccacccgcc	6900
	tcggcctccc	aaagtgtctg	gattacaggc	gtgagccacc	gcgcccagcc	tacttattta	6960
	tatttttttaa	gagacagggg	ctcgtctcagt	tgccagggt	ggagtgcagt	aggggtgatct	7020
55	gtaggaaagg	ggcttccagg	ccttaactca	tgtactcccc	cataaccagg	ttgggagggtt	7080
	agctcactgt	aacctcaaac	tcctgtgtct	aagggtacct	actagccctt	aggagagcag	7140
	ctgggactac	aggtatgcgc	caccatgcc	ggcttaattt	ttactttttt	tttttttttt	7200
	tttttttgta	gagacggggg	tctcactata	ttgccaggc	tggctttgaa	ctcctggtct	7260

caagcgatcc tcttgccctta gcttcccaaa gtattggtat cactgcaact agcccaaaga 7320
 attaatatag ctatgttcca tgtgatattt gggacatact tttctaaaag gttgtatctt 7380
 ttggatataa ttgtttatct gaaattcaaa tttactaga cattgtatat tttatacggc 7440
 aaccacacac ctgggacaat caagacattc cctgaagtta ccaggagaca atgcccata 7500
 5 gctacactt tccaagccc acgtcacaca agggcccttc cagagtattc cagacgtcag 7560
 gtagggccat cccttggttc acaagtccca ctcctaccac gcctatggca gccaaactga 7620
 aaggcaaaaca cagtgtctgga gacccacaaa tgccctgggc ctatagcagt caattccaa 7680
 gatgccccgc gtgaacacaa taggcaccgc ttccaatgct cgagcaaaga gaccagggca 7740
 aaaccttcca ctacgggaca ataacggcca gtcccacaa ttcgtgtgtg cagttcttcc 7800
 10 caggatgcct taggcctata gcgaccacct tcccagactc cccgtgtgga agcgctccaa 7860
 gcctccagga cggtcagcgg cagggtgtggg ataaaaggaa ccggtctcga caaggatctg 7920
 ggacactctt tcccaggatg caccaggcct acgactagcg gaccgactcc cacagcgtt 7980
 caaggcgag cgtcgggttc tcccaggatg ccccaggcg gcacaaacgc gtatggggag 8040
 aaaaagaagc cctcgggtca ccacggcccc agaccgccc ctcgccgtg acgggagtcg 8100
 15 tcgctcccat catgcagcgg ggccgtagcg cccgcttccc ggcatgcctc gcgacccct 8160
 gcccgggaca ctcaccggcg ccggcgcccc ccgctccggc tctgcggcgg cggctgcacg 8220
 cccagcctct gcgcctgcgt cgcaagtagg gtaggacagc gcgcaggggg cgtgaagagc 8280
 ctaggcgct tgccggcgga gacggactag tccgttagcg ctgtgggaag aggggctatg 8340
 cgcgctgggc cgtgcacgag acccgcgcg ggggcgccgt gctttgcccc tcgctgcctg 8400
 20 ggtttacttg gtacagccc cgcccaaaag gaacagaag ctgaagggtt cgcgcgctg 8460
 tgtgcggggc aggaacgcgc cttacaaaac tgggatgcgc tgggggtgga cagcactgga 8520
 tcggactgga tccctgggccc gaggcctgct tatttgata atcctagcgc gggacaatga 8580
 aaggcctccc gcaactggaag gactgatttg catattcccc ggaggggctt tactccagag 8640
 cgcatgtatt agcatatggc gggggcaacc tgagcaaagc gcatgcgcgc agggactgca 8700
 25 gactgacgcg aagtgggtag ccttgtcttc gtatgggagc agtttgcatc ctgagagagg 8760
 gcacaggggc caggacccct cccaaccagg ataaagggtt attgatctcc taggtgtcag 8820
 gcccctgctt ggccgattct gtggtttctg cagtgaacca tactcctgt ctcacggcac 8880
 cccagtcgaa ggagatacgc acctaattag acaactacta cccagaagg cagacctgga 8940
 gtgaggaaca cagggggctg tgggagccta agaggcgctt gccccggcct ctggttctag 9000
 30 aaagacttcc agggaggtgtt gatccttaag ccaagtacga ataggagcca actagaatgg 9060
 gaatgggtct ggcagaatga actgcaagcg ccaaggccca gaggccaaaa aaaaaaaaaa 9120
 aaaaatagaa gcgcattgtt tgattgagga agcaagagca gcttagtatg cctagaacct 9180
 aactggagac gggaaatggt tctatagacg atgttagagt tcaactatgg ctacattcca 9240
 gtcttctctg aagtgaactt gtcacattct ggcttaaac tccccaaaag ggatccctt 9300
 35 aggaaaaaaa aaaaatccaa aaacttttat catggcctca gggctataca cctggtctgg 9360
 ccgtgcttat ctttctgacc ccacctactt cctcctccct ccatttctgt ccagctccac 9420
 cttaccccaa actctttacc agctcgggccc tctgctcttg ccgttccctc cgctgaaaa 9480
 tgcttttccc tctgaccttt gaatacctac tcttggtgct accattcata tcttggtaca 9540
 gatgtcaatc tgagaggctt tccctgatct ctcataata gcacttacac atttgactgg 9600
 40 agttatggat aaatcgggat tggccatgag ttggtggtgg ttgtaactgg catgaagagt 9660
 acatggggct gggcgcggtg gctcacgccc gtaatcccag cactttggga ggccgaggct 9720
 ggtgtatcac ctgaggtcag gagcttgaga ccagcctggg caacatggtg aaacctgccc 9780
 tctattaaaa ctacaaaaat tagccagggg ttatgggggg tgctgtaat ccttgctact 9840
 tgggaggtg aggcacgaag atcacttgaa ccctggaggc agagggtgca ttgagtcgag 9900
 45 attgagccac tgcactccag cctggggccac ccagcgagac tctgggtctc gcctgtaatc 9960
 ccagcacttt gggaggccga ggcggggcga tcacgtcaga agatcgagac catcctggcc 10020
 atcctagacc atttctacta aaaatacaaa aaaaaaaaaa aaaaaattag ccggcgctgg 10080
 tggcagggcg ctgtagtccc agctactcgg gaggtgagg caggagaatg gcgtgaacac 10140
 gggaggcgga gcttgcaagt atccgagatg gcgctactgc actccagcct gggcgacaga 10200
 50 gcgagacttg gtctcaaaaa aaagagtaca tgggacgtta ttgtcctgtc tactctgtg 10260
 ggtttgaagt tttccataat gacaatggca taccacatca ccatactctg tactttatatt 10320
 aatagttctt atcacaatct gaactttctt tgcttctctg ttttgagtgt tttcctcatg 10380
 aaagcttcat gagggttaaga atggagtgc cctttttcac tttgggttct caatgcttag 10440
 agcaggatca gatttcagat tagtgtagcg ctgtctttaa cacttaacat ttgctgtttt 10500
 55 tattcaccat ggactctaga actttgagca gcacctggca catcgtaaga gggtattttt 10560
 taaagttaga ataatacatc taaaatgtac atgaatgaat gagaggcctg ggatgccaga 10620
 ctaaagagct ttgacttggc ctaaaggtga tggggagcta ggcaaagggt ttgagagttt 10680
 aactttaatt caaagttccc ttggagacta atgtctgggg tagggggaag ccagggttag 10740

	gggtccggggcc	atggaatggg	gtagctcagt	cgctatcaaa	aagacaagac	tgtgactatt	10800
	tggctgaaga	aatggccaaa	cccagggttc	tggggagggtc	gaggtaccct	cagtgaaggtc	10860
	aggaccttct	cctggcctat	actgtccacc	agcaaccatc	acactcctcc	ctccctctc	10920
	ccttagttcc	cctcccaatg	gtacagccct	tgacagcagg	acagacacac	agccacccca	10980
5	aacacttggt	ctctcctcag	tttaatgggtg	gttagtgaga	ttgccaaacc	ccctccccc	11040
	tcccccccc	accccgta	aaatgtgtgt	gtgggttttt	gttttttggt	ttttgttttt	11100
	taacaagaaa	aagggggcaa	aagccaggaa	tggggagagg	ggggtgcaat	ctgatatttt	11160
	catacagact	tttgattttt	taatata	tatatataac	catgaagacc	acgaatcctc	11220
	cccaactcc	tttccccctc	cccggggggc	ctggaggaga	gatggggaag	gccccccag	11280
10	gagtgggtgg	acagagagac	aaatatggat	gggacagacg	ttgggggaga	aggtagagag	11340
	aaggggagcc	caggaacctg	gggaaggggg	attggagaaa	aggggtgggg	ctgtctccct	11400
	cactgcccc	atcaaagtta	tgacacaaag	acacagaatc	cctattttcca	cgccctcccc	11460
	ccacccatcc	ccccaccgtg	caaacatggc	tttgcaaa	agtgtcccaga	gctctgtgga	11520
	actcttaca	tggtggcat	gggggtctagg	acccccaaag	aaatctgtgt	tccccctccc	11580
15	tgcccccccc	acccttccca	gaaactgacc	ccctccccc	aagacctggt	tttgtagcct	11640
	agggggccctg	gccttcccc	agttatcttc	ccccaaacca	atccctactg	ccctcactgg	11700
	acttgggggg	tctggacctt	tgccccctgc	ccctgggggg	acccagacct	ctgggcccctc	11760
	acttctggcc	cttacagaga	tccaggcatc	caacaccccc	atccctgccc	aagcgtctga	11820
	ggtgttagtg	gtggggggag	aagcccacca	tcccagactc	tggtaaatgt	ctttgtctggt	11880
20	tccttgccagc	tggcagtggtg	ggggacccca	gcccaggccc	aggcctaggc	ctgggggtggg	11940
	gatagggtca	gatgaagaat	tcctctttcc	tcttgtgtcc	gtcgtgcca	ttgaggaagg	12000
	cttctcttgc	ttctccctgt	tcctccaagc	cactggcttc	gtgggtcaga	taggaacctg	12060
	agggggtgac	agacccccgg	ggcagggggg	acatatttgt	ggatccagga	gttgacaga	12120
	agtataagg	aagagggaga	cagacaagac	acatgccagg	cgaaggaaga	gggagaaacg	12180
25	gaacacacag	ggagaggcag	agaaagggt	aaacagtggc	agagaaagag	gtaaaagcag	12240
	aattaggaag	actccaaaag	ctcaccgaaa	gtgccaccct	tatcctttct	cttgagggtta	12300
	tttcttggcc	ctgctcccag	cgaattcagc	aattaggaaa	ataaattggt	ttattcaaat	12360
	ccatgctctt	ttttccct	aatttttgt	atttttagta	gaaaaggggc	tgcgccatgg	12420
	tgccccaggct	ggtctcgacc	tcctagcttc	tcaagtgtct	tatccgcctt	ggcctcccaa	12480
30	cggtgtggga	ttacaggcgt	gagccaccgc	gccccaccgc	aaatctatgc	ttttaattca	12540
	gcttctaaat	tctaccctt	ttcgagtatt	gtgccgaaag	ccccgcccc	tttgtcatct	12600
	ccgcccccg	tgcgcgggga	tttggaatcc	agagcctagg	ctccgcccctc	tcgttaccct	12660
	ggctctaggc	cccgctctt	tccgagccct	acaaccaacc	aaccgtagag	tccaggcccc	12720
	gtccccactca	cccttctgcc	gtaccgagca	ccagaccatg	cccactagca	cacatatgat	12780
35	cagaaacacc	agcagcgcca	ggatgccgc	cacaatggca	tagggaaccg	acgtctgagc	12840
	ctctaccacc	gcaccagggt	ctgccagagg	gacacggcac	aggaccagg	catcagagc	12900
	cgatcccagt	ctggccccat	cgctgccaa	cttttaagcc	attctgcaca	cgtctaaccg	12960
	tgccctttta	tgtgccacac	ccctcaaaaa	ttactgccac	cttgtagtct	cttctcttct	13020
	cagatgcttg	ttggtttgta	cactgcccga	ccctccct	gagtcagtgt	acattttcct	13080
40	tttcttttct	ttgttttctt	ttgcagagac	gggggtctca	ctatgtggcc	caggctgac	13140
	ttaaactcct	gggtcaagc	gatcctccgg	cctaggcctc	ccaaagtact	gggattagag	13200
	gcgtgagcga	ccgcaccag	ccatccctt	tcttttgact	caagtctctt	cctccactaa	13260
	gaaacagagt	ccaagaaaca	ggtccaagtc	ccttcccacc	ttgtctaaaa	cgctccaagt	13320
	atttaaagt	ctggggccaa	ctaccaaaat	ttctgcccc	ccgtcataga	gctaaacaca	13380
45	gaacagctgt	gtgctagagc	ccattccaac	caccttacat	atttagttca	cataatcttc	13440
	acaacagcct	tgttatatag	gtgctattgt	ttatttccac	tttactgatg	ggtaaaactga	13500
	ggcgagagca	ggttcggtta	cctgcaatag	aatgcagcca	acccgaattt	gagccccg	13560
	ggccagctctg	gtcccaaaac	aaaaagaact	ctgttggtg	ccgaacccct	gagttatgtg	13620
	gcctctttgc	tcaagccccg	cccccgccac	ctggcgcccc	gcccccgccc	tcagtggccc	13680
50	gcagcctgct	ctcaccgtag	accacaagta	cgtagagcgc	cctcgcatgg	ccgtgcttat	13740
	tggagcctc	gcaagtgtag	gtgcccgtat	ccgcccgtac	cagaccggc	agcgtgagcg	13800
	tctctccac	ggcctccg	ctctccggca	aagactcatt	cccgcggttc	cagcggatct	13860
	ggtttggcct	gggtggggat	aaagtatagt	gagagttagg	aaccgaggtg	ccagcacc	13920
	attctgactt	gtcaagaatc	tagacatgca	actctcatcc	cgcagggacc	tccaaataag	13980
55	aggttctctg	ctatctcttt	ccttctctgga	aaaccaacag	tcctgggccc	acttccaccc	14040
	atcaccaagg	tctcaggaat	tctagcccag	gctgaacatg	gtggttatg	cctgcaatcc	14100
	cagcacttta	ggaggctgag	acgggaggac	tgcttaaggc	cagcagttcc	agaccagcct	14160
	gggcaacaca	gggagacccc	gtcactacaa	ttaaaaaata	ataataataa	taataataat	14220

	tctagccctc	ccacgccatt	ccatcctcag	caaccaggag	tctgaggctg	cacagcttca	14280
	gtattgggga	gtctgagcct	ccagattcct	cctccctcag	gatccaggag	tccaggtccc	14340
	agatccctat	tcgteccagg	ccccagctct	ctcctcctca	ggacccagga	atccaggtcc	14400
	tagctccctg	tttgtccagg	tcctcagctc	tctcctcctt	aggacccagg	agtcceaagtc	14460
5	cctgggtccct	gttctttccag	gtccccagct	ttctcctcct	gaggacgcag	gaggccccca	14520
	gagctcacct	ggggttcccc	gtgacagcac	acgtcaacac	cagcgtgtct	ccctccctca	14580
	ccacagcttg	ggagggcatga	atccggggcg	tgggggagtc	tgtaggcaa	aaagtaagagg	14640
	agagagtagt	ttccaagcca	tcacgcagga	caagggggac	cctcgcgggg	gcgggtggct	14700
	ggcgttggga	tcccttgggt	cctggcccgc	cggtcactta	cactgcacat	ccagcacgta	14760
10	ctgcgtctgc	ttgctgtgtc	cggagggcag	cgcttggttc	tgcgctcac	agatgatgat	14820
	accaccgtcg	tccttacggg	ccacacgaaa	ccgtactgtg	cttgccacgc	tccagacctt	14880
	gccattttcc	tgggtgtgtc	tactcctgc	cacaccccg	tcagacactg	tcaggccaca	14940
	attccgggtc	catccaccca	cccaccgag	ccaacgcca	agcaggctat	ttgccaagct	15000
	ccaccctta	cccacaggcc	cgccctcttg	tctccaagc	tacgcccctc	ccctaaccac	15060
15	gcccacgtgc	ctcctcccaa	agctcttccc	tctttcacgc	tcagtctttc	tcgtctatca	15120
	atccatttaa	ttgctatata	tataaaaaca	taaatttata	tataactta	gagacagggg	15180
	ctcacaatgt	tgggcaggtt	gaactcctga	cctcaagcaa	tctctccatc	tcagcctccc	15240
	aaagtgtctag	gactacaggc	gtgagccacc	gcgctcgaca	tcaaccacta	catattgaat	15300
	gtccagtgtc	tgtgaaaacc	tgtggctcct	ctccacatat	aaacaacctc	tcctaagttc	15360
20	cacctctccc	ccatcccttg	tcagcactcg	gcccagggtg	cctttcagct	ccttgccggc	15420
	ccggtaccag	cgacgggtgg	cagccgcgga	ggacggcgga	acgaggcagc	tgagctccac	15480
	ctcgccgccc	tctaccgcct	gctcccggac	ctccaccaca	ggattctctg	gggccactgc	15540
	cgaggggaga	aggggaagtaa	gggggttaaag	aaggcacgaa	cgtggggtca	aagcgatcga	15600
	gctgcctgtt	cccagcgacc	ataggggaacc	aggggtcccag	gtggcagggg	tcaaagggga	15660
25	gaggtcagga	gccagatgcc	catccaggat	gttaaaaata	gccatggtct	gaaagtctca	15720
	ggagaagaga	gaagcagaga	agaaaggagg	agaggatgcg	tctgacaagg	gggagggcgt	15780
	tacctagtac	cgtgagcgtg	gcaatctggt	gggtgggtgtc	ttctgtgtag	agctggcaga	15840
	aatagccccc	ctcgtcctcc	aggcgggcat	ctgagagccg	gatccgcacc	cggcgtgggg	15900
	agaactcctc	aagctggaaa	cgctcatcct	tcaaggctag	agagagttag	gggggaaggtg	15960
30	tgaatttcgg	gagtcctggc	ctcacaagtc	ccaccttcc	gacaggagct	tagagtccag	16020
	ccctctgcct	cttttctcca	gccatatcta	tgagtctgag	gtgtccaact	atttactccc	16080
	ttgaggaccc	agcattattc	aagtcctcct	gcctgcagga	ccagcagtcc	gggacccccag	16140
	ccctttcttc	tccgagaccc	aggagaccaa	actctcagg	gtgtcctctt	tcaggacatg	16200
	ggagcctggg	ccccagccct	ctcttctctt	aagactcctg	agtctgggtcc	ccagcactca	16260
35	ccacgggtgc	cattgaagaa	gaggggtgtc	cgggtgggtg	tctggatgac	aactatggac	16320
	ccatcatact	ggtgcagacg	gcaggtgac	tcagccaccc	cacctcagc	cactgtcacg	16380
	ttctctgtct	gtacttctctg	tcctgcccct	ggacgattag	acaaagagac	aggatagaag	16440
	acttactgag	agctgcaatt	caattttttc	ttctccctc	ttcccatcc	aaacctccaa	16500
	tcctctctct	tcccctcatt	cattccattg	cactgaacat	ttcctgcagg	ctagagtcca	16560
40	ggacagggag	gaaatctgct	ccctactcta	aaagagctgc	agtcaagatt	tagtagaata	16620
	tgtctaatg	agggcagcac	agggcacact	aggagcccag	agcaagggag	gactattata	16680
	gaattgccta	gagagatggg	tagccagaga	gggctctgca	agaaagctcc	attggatctg	16740
	gatcttaaa	agtaagcagg	aggctgagcg	cgggtggctca	tgctgtaat	cccagcactt	16800
	tgagaggccg	aggtgggcgg	atcgcaagg	caagagatag	agaccatcct	ggccaacatg	16860
45	gtgaaacctc	gtcactacta	aaaatacaaa	aaaaaaaaaa	aaattagctg	gggtgtgggtg	16920
	tgcgcacctg	tagtcccagc	tactcgggag	gctgaggcag	gggaatcgct	tgaacccggg	16980
	agtgggaagt	tgcatgtgag	cgagatggag	ccactgcact	ccaggctggg	cgacagagcg	17040
	agactctgtc	tcaaaaaaaa	aaagaaagaa	aaaaaagagt	aagcaggagt	tcacaagggtg	17100
	tgggagactg	ctgtgtgttc	accaagcctc	atctttcaca	cctgggcaca	tgttgtagcc	17160
50	cgtttgcaaa	gatagccgta	atattctcct	gtccctggac	atgccccttg	caagttgatt	17220
	ttgccattcc	tccatttgag	aaggcacttt	gtcccctact	agtctgggta	agccttgaga	17280
	gttgctttga	ccaatagaat	ttgctagaag	tgatattgag	cctaggcctg	aagaggcctt	17340
	gtagcttcca	ctcctgccct	aagactgttg	catgaagata	cccagactag	tgtctttgca	17400
	gatgaacaat	catggtgaaa	gagaagccca	gccggcagcc	agcaccaatc	gccagctgtg	17460
55	tgagtgtggc	catcctggat	catccagccc	cagctgcccc	accagctgac	agcagccaca	17520
	caagtgaccc	cagttgagac	caataaaaga	tctgcccac	tgatacagcc	caaactgctg	17580
	aacccagaa	tcatgaacaa	ataaggtgg	gggtgtttta	agctcctaag	ttgtgggtga	17640
	tctgtcttac	tgctaaagtt	aactgatata	atacataatt	aggctatact	tcccagcatc	17700

ctttatagtt aggtggggcc atgtgaccaa ttctggccaa tgggatgtag gtggaagaga 17760
 aacacctctt gcagcctgac ccatctccct cataatcctt cacactggct gaacagagag 17820
 gactccaagg agcctagagg agggcagaat cacaagccag aaggaaacctg ggtctctaac 17880
 tgactgtccc ccatgacccg cctgtatagg actgtgatat gagcaagaaa tatacctttt 17940
 5 tgttaagcca ttgagatttc aggggtgtct gttacagcct ttaacctacc ctgattaatc 18000
 catcagaaaa acaaggtggg gaatctagaa ccatcagaga aaagcattha ggaaagctga 18060
 aagccaagac taatcatcag cattaatate atcatctgtt gtcttcaaaa taacaataac 18120
 ccccatagct accaattatt aggtacttgc agtgttagtc cctgtgctaa gggcattacc 18180
 catataactt acctttaatc ctacacatcc ctgtgtaagg tagacatgat tattatcatt 18240
 10 attattatta ttttgggaca gagtattgct ctgttgccca ggctggagtg cagtgggtgtg 18300
 atctcagctc attgaaacct ccacctccca agttcaagcg attcttcagc ctacgcctcc 18360
 caagtagctg gaattacagg catgcaccac catgccgggc taatttttat ttttagtaga 18420
 gacagagttt agccatattg gcctggctgg tctcgaactc ctggcctcaa gtgatccgcc 18480
 tgctcagacc tcccaaagtc cagggattac aggtgagacc caccgcgctt ggccaattat 18540
 15 tattattatt ttttaattga gacaaggtca gctgtgagtg cagtggcagc atctcagctc 18600
 actgcaatgt ctgcctccca ggctcgagtg atccacctc agcctcccca gtactgtgaa 18660
 ctacaggtgc acaacatcac acctggctaa cttttgtatt ttttagaga cggagtttca 18720
 ccgtgttgcc caggctggctc ttgaacttgc gagctcaagt gaactgcctg cttcggcctc 18780
 ccaaagtgtt gggattacag gcatgagcca ctgtgcccgg cctgcgctat tattatcccc 18840
 20 attttggccg gcctgcgcta ctattatccc cattttcccc catttccatt tttcttttct 18900
 tttttttttt tgagacattg tcttgccttg tcgccaggc tagagtgcac 18960
 tggtaacgat tcggctcact gcaacctcca ctcccggtt tcaagcaatt ctctgcctc 19020
 agcctcccaa gtactggga ttataggcac ctgccactgc acttggttaa tctttgtgtt 19080
 tttagtaaag acgggtctc accatcttgg ccaggctggt ctggaactcc tgacctcgtg 19140
 25 atccacccgc ctccgctcc caaagtgtg ggattacagg cttgagctat cgtgtcctgc 19200
 tcccatctcc attttatagg tgagaaaatt gggccacaga gatgaaatga cttgcccaag 19260
 ttcacagcca agagtggcag tgccaaaatc ttctgcaaaa tctctgattc tgtatcctga 19320
 atctgtatat ccactcctgg ctgtctggat taagtgtcca tcattggcag ggggttgtga 19380
 gagcgcttg tgatgggct cgaatgccaa ctaggagat tgctttcat cctaagggac 19440
 30 agtgaagggt ttgaagcagg aatatgccat gattagatct ggctatttgt ctttaagtcg 19500
 tggataacta tccatgtctt ttacattcag gtgctgggtt gcattcattc aggagtattt 19560
 cctgagcatc acgtagggtt tcaggggctg agtagtcaga gatgagttag atgaggtccc 19620
 tgccctttaa gatttatggg aaggtaggaa ccaatcacgg taatcaaaag tgttatgtgg 19680
 ctgggcacgg tggctcacac ctgtaatccc agcacttttg gaggccgagg tgggcggatc 19740
 35 acaaggtcag gatttcgaga ccagcctgac caacatggtg aaaccccgctc tgtactaaaa 19800
 atacaaaaat tagccagggt tgggtggtgg tgcttgaat tccagctact accgagctg 19860
 aggcataaga atcgcttgaa cctgggaggc agagggtgca gtgagccaag atcgcgccac 19920
 tgcagtccag cctgggtgac agagcaagac tccgtttcaa aaaagaaaaa aaaaaaagaa 19980
 ataaataaaa gaaagtgtta tgttttctgt aagagggtag gtaacctaat ttggaagtgt 20040
 40 aggggtagaa aagattattt ctgggggatg gagacagaga cttctggctt cctattctga 20100
 catccatttt tccctttctc ctacgtaaaa gaaaagaaca ctggttgtat tttatggttg 20160
 cactatgtcc agcagaaaaa ggcattcctc agtctccttg cagcaaggta aagccatctg 20220
 ataaaatttt gtccagttgg atataagcca aaatgttgcg tgacaatttt gggaggactt 20280
 cctgaaacag gtggacaaac ctttttcta ctgagtcacc tttgtgccac ctggaactaa 20340
 45 cagtgtgacg cgtggaattt aggcagccat attgaaccat gaggacaaga gcagtgggga 20400
 tggcggaacc aagagctgga aggtgcctga gtctctggtg aagatgtgga gctgctgtaa 20460
 cagccctcaa ctccagttc tggacttctt ttatgtttta gtgtaacgct ttgggtattt 20520
 ttattttttt aatttatatt agagatgagg tctcactatg ttgcctaggc tggactcaaa 20580
 ctcttatgct caagcagtc tctgctca gcttcagtag tagctgaaac tatagcactt 20640
 50 tgggtatttc agccactgtt tgaggttttt ctgacacctc ctggaatatc aagcttaaca 20700
 tgtccaatcc ttgcccaga tattttcttc cccaaatttt ctcaatctca ataaagtca 20760
 ccaccatcca cctgggtgct cagggtcaaaa acctagaaat cattcaagtt ctctcccttt 20820
 cctcatcccc caatatccat tccatcagca acatctgtcc attctacctc caagacatat 20880
 cccagatctc atcaccttg tctgcctctc ctaccctcac tctcatccag catcatccct 20940
 55 cacctggact ctgcaaaagc ctactcgtgg gtctgtctgc atccctgtct gcctcctcca 21000
 gggccattct ccacccagtg gccggatcga tttttcaaa aggtaaatca gatcaattca 21060
 cttttctgct taaaacctc cgagggtgc ccgtaacatg tagaataaaa tagagacccc 21120
 ttcccgggga cttcaagggt ctatatggcc tggcccttg ctgaccttac ttcactctgg 21180

	gctcgttagc	cttgcgtgccc	ctcaaaccatg	ctgagctcgc	tcccaccaca	gggccttttc	21240
	cctttttcttc	cttctgcctg	gaatgttctt	ctccccacct	cccaagcccc	atcttcccag	21300
	ggctgactcc	tggtcccat	tgggtctcaa	atcatatcag	taccttctca	gagaggcctt	21360
	ccctcactgc	tcattccctt	accttttagaa	cactttcttt	tcttttaaga	gacaaagtca	21420
5	gcccagtgcg	gtggctcacg	cctgtaatac	cagcactttt	gagaggccaa	ggcgggcaga	21480
	tcacctcagg	tcaggagttc	aagaccagcc	tggccaacgt	ggcgaaaccc	cgtctctact	21540
	aaaaaaatac	aaaaattagc	taggcagtg	tagcccgggc	tactcaggag	gctgaggcag	21600
	aattgcttga	acccaggagg	cagagggtgc	agttagccga	gattgagcca	ctgcacccca	21660
	acctgggtga	cagagagaga	ctctgtctca	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaag	agacagggtg	21720
10	ttgctctgtc	acccaggctg	gagtgcagtg	gtgcaatcat	ggctcactgc	agcctcgaa	21780
	tcctgggctc	aagccatcct	cccacctcag	cctcctaagt	agctgagatt	ataggctcct	21840
	cccaccacac	ctggctaatt	tttgtgcttt	ttgtggagag	acagattctc	catgttgccc	21900
	aggctggctc	ccaactcctg	gggtcaaagg	atcctcctgc	ctcggcttcc	caaagtgctg	21960
	ggattacagg	cgtgagccac	tgcgctggc	ccagaacact	tgctatttcc	tcaccattgc	22020
15	tttatttctt	ctatgaagat	ttcactggaa	ttatcagatt	aatttgctta	tttgtttact	22080
	gtctgtttgt	cacccatgac	tggaatgtat	actctaggaa	ggcagggata	taatccaatg	22140
	ggtttactgc	tgacccctca	gtacccagaa	gagtgccttg	cacctgataa	gtgtctgggg	22200
	aacttgctac	atgaattaca	tgtgtcagat	gggatattct	ttcgtctttc	ttctctcttt	22260
	tttctttctc	tctttctctc	tctctttctt	tctctttctt	tcttttttct	ttttttgaga	22320
20	taaggtctcg	ctctgtcacc	caggctagag	tgcatggtg	caatcatggc	tcactgcaac	22380
	cttgaacatg	tgggctcaag	cgatctctcc	acctcaggct	accaaatagc	taagactaca	22440
	gaggtgcgta	gctatgccc	gctaattaaa	aaaaaaaaaa	tttttttttt	tttttagaga	22500
	tgggggtctc	aatatcttgc	ccaggttgg	cttgaactcc	taggctcaag	caatccccct	22560
	gccttgccct	cccaaagtgc	tgggattata	ggcatgagcc	attgcagctg	gcccagacag	22620
25	aatctcattt	cagcccgaca	actttgtgac	atcattattt	tcattctaaa	cacctagggt	22680
	gatcccagct	caaccacttg	ccatctgtgt	gacctgtggg	caagtgcact	tacctttcgg	22740
	agcctcagtt	gccccatcta	taaaatggga	atgatgccag	tgcctgcctc	ataaggatga	22800
	gccccgctcc	tgaagctcag	ggagccctct	ctgcaaggct	gttttagtgc	aacctccgga	22860
	aacatgccc	tgcatgtgaa	aactggcatg	cacattctgg	tgcttttaaa	aacatctcga	22920
30	agcctatcca	cagatcctgg	acctcaagac	tgggtcagtg	ctagccccc	attttacaga	22980
	tgtggagaat	gaggcttagc	gggtcccagg	caagtccagtg	gcaaaactca	ccatctcctg	23040
	ggagccatca	ggttcctctg	gatctgcccc	caccaaattt	atccccctgt	ctctgcttga	23100
	gggtgcacat	ggggtgaggg	tgggggtctt	ttgttttact	ccctccccct	cctgaggagt	23160
	cagtaaccaa	cagtgtctgt	gcctggaata	ttaatgtctc	agcagctttt	gtttgggggg	23220
35	ttgggggtgg	tgggggctgg	actttctggt	cagagagggg	ctgagctttg	gggactgagg	23280
	cactggccct	ttaaactgtg	ttgacagcca	ggagtcgtca	tggggatggg	gcttggaata	23340
	ggggacaggg	agggtttggg	aaagagtggc	ggagcaggta	atgcgtaaga	cccaggaatc	23400
	cagcccccaa	ctacctctc	tcccaggacc	caggagtcta	ggctcccagc	ccctcctcca	23460
	tcaggttcca	ggagtctgga	accccggtct	ctttccgcct	tagaccagg	aattcagccc	23520
40	ccaaccacct	cctctctcag	gttcccgaaa	tccagacccc	tagccccctt	ctcgatcagg	23580
	acccaggagt	ctgggctgtc	agcagcccc	tccttcaaac	ctaggagtca	gagccccca	23640
	ccctctccta	gcttagacac	aggagtcttg	gcctccagcc	ccctcctcct	tcaggaccca	23700
	ggagccaggg	gtccagagta	cacagctggg	ggatgtttcc	acggagacta	agcaggggtg	23760
	ggggagcgct	tcctgggtcc	tgagtcagcg	aatacccaag	ggagtctcaa	ggtcatagtt	23820
45	ccgggaaggt	caccaccacc	ccctctgtat	ccgtcccca	gggggctcct	ggcatcctgc	23880
	ctccttcccc	cttctcctc	tagggagggtg	gtacatccct	gcgtcctgac	tgaaccccc	23940
	tcagcccccc	atcaatggcg	gagtccgaac	atcctcgcac	aaagcgtaaa	ttcttcccc	24000
	gctcagcctt	gtgaaggcgc	ctgtattctg	aggacctagg	cgtcagggtc	tcagccccct	24060
	ctcctcaga	aacctgcagt	ggaatcccc	gcctccagcc	ccttctctcc	tcaggaccca	24120
50	ggagtctgta	tcctcatccc	ttcctccctc	aagacctagg	agtgtggact	cccagcccc	24180
	ttttctctcc	ggacacagga	gttccagccc	tcggccctct	cctctcttaa	acccaggggt	24240
	ctaagacccc	agcctctctc	tcctcaaacc	tcaggagtct	aagatcccag	gcccctctc	24300
	cctcagactc	aggagtctaa	gatcccaggc	ccctcctccc	tcagactcag	gagtctaaga	24360
	ccccaggccc	ctcctccctc	agactcagga	gtctaagatc	ccaggccccct	cctccctcag	24420
55	acccaggagt	ctaagacccc	agccccctc	ccctcagact	caggagtcta	agacccccag	24480
	ccctcctccc	tcagactcag	gagtctaaga	ccccagcccc	ctcctccttg	gacccaggag	24540
	cctaagacct	cagccccctc	ctccttgaga	ccccaggagc	taagacccta	gctccctcct	24600
	ccttttagacc	cattagtcca	ggcccccaga	ccctcctcca	tcagacccag	gagtccaggc	24660

	ccccagcccc	tectccatca	gateccagccc	ctcctctcct	gaaaactttt	gactctaact	24720
	ccccagtctt	caacccctag	aagcacagtc	ctgcctttcc	tcaatcctct	gtccccctcc	24780
	atctggggac	ctagggcatca	ggtgggggag	taggggtgag	tcagcaacct	cacacacaaa	24840
	gtccccgctg	tggccccccac	attcctggga	tattcgggac	tccctggatt	ccaggcctca	24900
5	ggccccagcca	gggagtgggg	agtccccccag	aggctcctccc	tgggtgtggg	gtacgagagg	24960
	aattcctgct	ccgggaaggg	tgcaggcctg	cactgagctc	cctctgtccg	aacctccacg	25020
	cccagtgcct	tctattcacc	ccctcttccc	agaagagccc	aggctcagca	cctgccccct	25080
	gccccactgg	gtgcccacgg	aggagcctgc	gtgcctgctc	cctatggggc	tggggtctgc	25140
	acaggcgga	atcagtgggt	gcttccgttc	tgatgccaca	ggccattgga	tgctggcggg	25200
10	tctgactgtc	tccaggccac	ccccacccc	tcccagagag	agaaagctgc	ctttgtgttc	25260
	tccaagatgg	ggacaggcca	ggctcgcacg	acattaaccc	agccttaggc	cccagccctg	25320
	ctgtgtctaa	ggtcttgga	tccactgcag	aacctgaccc	ccacccccag	gctctgggga	25380
	cacaggcgcc	tggctcatgg	gtgggtgggt	gggggggtca	gtgatagaaa	cctccaaaac	25440
	ctgttccttg	gggtgactca	caatggaggg	agggctcccc	tattctcaag	agtggctggg	25500
15	cagaatttta	gcaggaaaaa	gtgagtcacc	ctgggaagga	aacattattt	agggaccaac	25560
	aactgcccc	tccacaagac	ccctcaactc	ctaatagcct	ctctattctt	tctttgtatt	25620
	ggatatctgt	tctctctcct	cctttctgtt	ctaccagtt	tctggctgcg	ggteccattt	25680
	ctgcctgggt	gcacccctgg	gcaggcaacc	catccctccc	tcttgctttc	tctcctctgc	25740
	ccaccctgga	tccttctttg	ggcataaate	tcacttctct	ctgctatgct	cagaagatga	25800
20	atgaaccagg	agagagagaa	catgttttta	aaatggcgca	aatgcacccc	atctcccccg	25860
	attcctgctg	gctgggcaag	gtgagagagg	aagaagtgc	taagagagaa	atgtgggaac	25920
	aacagatacc	ccctaaaatg	tggtagccaa	ggccactgag	aaatatccaa	tggaaaaggag	25980
	agcaggaagg	gccctccaag	accacatgct	acagcctcct	accccatgct	ttacagacg	26040
	ggaaagtaag	gcccagagag	ggacaaggac	tgatgcaaaa	ttatactaaa	gggtcctggg	26100
25	taaggcttgg	acccaagtct	cttagctccc	agctgagagc	tcttcccatg	acaccaagct	26160
	cagtttctac	tggtaaaagc	cacatactat	ttactttaga	gaaagtttac	agagagggtt	26220
	aggggtgccg	gaagcagtga	cttggaatc	aaacgaggga	cagggctgta	gacctaaact	26280
	ccagaagcac	cagagaaagg	cttttgcacg	gggcgggtgg	tcaccttaag	ctatattctg	26340
	atcctgagaa	ttcaaaagtct	gatgattcta	agctgtcagg	attctaaaatg	tcataagctg	26400
30	caagatccag	gaactccaag	acatcaagat	ttcacgattt	ttaagacgct	aagatgctag	26460
	catgctaaca	ccatcacggt	tctagaactt	taaagggtgc	aagattctaa	agccttctgg	26520
	attctagaat	cctgtagatg	tcagcattct	aaagtacat	caggttcttt	atttactgga	26580
	ttcattagtt	ccaggattct	atgagcctgg	tgtttagcct	aaaaaataaa	gataaattaa	26640
	aattgatgga	aatgtcactg	aggtaacaaa	gttctcatct	gggaaattgt	ggcatgtctg	26700
35	ttgtaaaaga	aggaggtaat	gatgcaagtt	ctaaagcagt	cacagaagac	tagagaagaa	26760
	agaaaagaca	tgagaggaca	gctttgcccc	tactcctggc	cgaggtgagg	atggctctgc	26820
	ctcaaacctt	ggagtgggga	acatgtaacc	gcactcaact	tgccagaaac	cccttcacgg	26880
	tctgagctgg	cgttcccttt	catgtcactg	agttcaacat	cctcacttta	cagaaagaga	26940
	aacagaagcc	tggagagagg	aaggtgttta	ccattggctg	cgatggcaaa	tggcaagagc	27000
40	caagatttaa	gcccaggccg	ccagccccat	gccacctggt	tataactcct	ctcaccaatc	27060
	tctgccgaac	acccagccct	cctgcttctg	cctagccacc	ttccaatcct	ctgttccctc	27120
	caaaagtggc	cttatccacc	agggaggggt	gacccgtggc	aggttcaaga	cttacacagt	27180
	gtgagagtgt	gtgtgggtga	catttctctga	ccttgtcccc	attctcaggg	tcaccaacc	27240
	tcgggggtct	ccagcttctc	acagtgtgtg	atgagggtat	gtggatggct	ccctggatgt	27300
45	cctggacagg	ggcttctctg	tgagtcaagc	ctgggtgtgt	gaatgggtga	gcagggtttg	27360
	gagaggcatt	cgctgaatcc	acgtgtgtgc	ctacacgcca	aggtccccca	ttctcacttc	27420
	cccacacaca	tgcacacaga	tgttccccct	cagggctctt	tagaatgccc	tgctgactg	27480
	aattcctctt	caggggcaca	gagggataga	gagaggagg	aaggtaggat	gggaatggga	27540
	gatccccggg	tggaggctgt	aagcgtagag	agaggaggca	cagcagaaag	acagggatgg	27600
50	agatagtggg	acagagaagg	gggaaagaga	caggtgacag	aaagggttag	agaaaagag	27660
	gacagaaaaga	caggggacag	agacaagggg	atggggcaga	taggggacag	agaaaaaggg	27720
	acagaaaaac	aagggtgaca	gcgagacaga	gacagggacc	aagaataggg	gcagagaggg	27780
	agggcagaaa	tcggggggaa	agagaataga	caggatgatg	gaggggacag	agtgaccacg	27840
	gaaaagggga	cagagaccag	gggacagagg	taggggacaa	agacagaata	gatgagggaac	27900
55	accgaggcaa	gaagagaggg	agacagacag	aaggagggac	aggacttcga	gactgaggga	27960
	tagaggacaa	gggtaggggg	acgaggagcc	agacgggggg	gttcagagac	gggcggacag	28020
	agggacgcag	agactggaca	gaaggacagc	gggaccggcc	tggggagggg	ggacttgtgt	28080
	gtgtaggggg	gtctcggggc	ctttgtcccc	gccgggatcc	agcctgcgcg	ggtggggggg	28140

	ctgcggcacg	gcggccgggc	ccgcgcgcgc	ctcccccgct	cgctcgctccc	ggctccccggc	28200
	ccgcgctgcg	ctttgtcccg	gggagggggc	ccggcccggc	cccgcgcgca	ttgttcggcc	28260
	tctgcggccc	cgaggctgcc	gggctgtcac	cacagcgcgc	cccccgcccc	agccccggccg	28320
	gccgaacccc	gcccccgacc	ctacctggcc	ccgcgcgggc	cgcccacagc	agcagcagcg	28380
5	gccactggaa	gcgcggggcc	cggcccatgg	tgccgcgcgc	gccgcgcgcg	ccgctcgctc	28440
	ccggcccggc	acctgcaccg	cccgcgccgc	ccgccccgcg	ccccgcgcgc	cgccccctgc	28500
	ccgccccggg	gcggggcgcc	gaggccgggg	cggggcccgg	gaggggaggg	ggagacggag	28560
	gagaggcccc	gagacaatcg	gggggacggc	acgggtgggg	aacgggtgcg	ggtgcaaaag	28620
	ctggagagga	gaggggtgag	gagggcgagg	aggggtgcgc	gggagggcga	cagcggcgctg	28680
10	ggagcaggtg	ggggatctcg	gtgagcgcgg	gaaatggagg	gtgttgggtg	aggggtgctgc	28740
	gtgcgggccc	aggtgctgcg	cgcgagggtg	cggagttgct	ggcatgcagg	gtgcttgcgc	28800
	tgccgcggagg	ggaggggtgg	aggggtgtgc	tgagggctgt	gcgaggggtg	gggcgcggggc	28860
	gtcgtggggg	gcggtgtgtg	gcgaaggaga	cgtgcccag	cgtgacgggg	gagcgttaag	28920
	gaggtgagtg	gacgtgggaa	aggtgagtg	gagaggcggt	ctgcgggcag	gtgggtgtct	28980
15	ggagtctagc	gagaggctgt	gagctgagcc	accgggacag	gggagggctg	agctggaggt	29040
	ccggaggggc	cggaggtcga	ggcaggtcaa	ggatctccca	gggcagggcg	aggctggggc	29100
	tcaggagtg	ggtgggggtca	gttcctctcc	tccctctctc	ctgtcctgac	ctgaaaaccc	29160
	cgtgtttccg	cgtcattctc	cgggaggggc	ccctgaaaag	tgaactaact	ggaaggaagc	29220
	ctgaatcctg	ggtcccaggga	gggagaggct	cctgtgaaca	ccttccaagc	cctggcgctg	29280
20	cctctcctcc	ctgctgtctc	ctgcggccag	cctctctccc	tctctctgca	tgtatttgcc	29340
	tctgcctctc	ctctctcccc	atcttttgag	gtgactcacc	cctccagact	taggtccctt	29400
	ctcctcctcg	ggagtgggtt	tccctgagcc	cacttctgtg	acacctgtga	gacctgatgc	29460
	gggatcatta	cctatgggac	ccagaaagag	tgagaaacca	tggaaagaag	gcctcgacct	29520
	ctctcatgcc	catttgtcag	gcaaactgag	gtccagaagt	gccaattatg	aacatctttc	29580
25	cttcccccc	ccccctctcc	cgcccgagcg	gagtctcgct	ctgttgccca	ggctggagtg	29640
	cagtggcacg	atctcgactc	actgcaacct	ctgcctccca	ggttccagtg	attctcctgc	29700
	ctcagcctcg	cgagttagctg	agattacagg	cggccgccag	catgcctagc	taatttttat	29760
	atcttttagta	gagacggagt	tttgccatgc	tgccaggct	ggtcttgaac	tccttaacct	29820
	aggtgatcca	tctgtctggc	ctcccaaagt	gctggattac	aggcgtgagc	cacctatgct	29880
30	ggctgaaaat	ccttactttt	tattccgact	aaaaaatttt	acatccagtc	ccacaaggga	29940
	cttcagcttc	acacaccctt	tctgtcctca	gtacccagct	cccagtatcc	ttcttgacct	30000
	caaaaccata	gctaccatca	acccttgtgt	cccaggacca	tggctcccag	tgtcttctct	30060
	gtcctcaggg	tccaagctcc	catcaactcc	tgtgtcctca	ggaccacggc	tcccagcatc	30120
	ctctctgtcc	ttcaggtcca	agctcccatc	aacctctgtg	aagcaggacc	atggctccca	30180
35	gcctcctctc	tgctctcagg	gtccaagctc	ctatcaactc	ctgtgtcccc	aggacgatgg	30240
	ctccagcaat	cctctctgtc	ctgagagccc	aagcttctaa	ctgcccctgt	gtccccagat	30300
	ccatagccct	gagcaacttc	cttctttttc	agtcctcagc	ttcccagctt	ctgtagactt	30360
	gggaagagat	agtctcta	cctctttcca	gggtccacat	tctgtgactt	ttgctagatg	30420
	ggagaggaat	gtttgatctg	cctttggaat	actgggtccaa	ggggtaacta	gtagttgcct	30480
40	tttcccgcag	gagccaatag	gcccgtcac	tctgtgctct	gacagatgtc	tcctgtctcca	30540
	gctgaagggg	aaccttgagg	gatgttggtt	tggttctcac	ctgtcatcct	taagtcccac	30600
	cattccatgt	gaagacatca	caagagtagt	ggtcctgacg	ggcgcggttg	ctcacacctg	30660
	taatcccagc	actttgggag	gccaaagggtg	gccgatcact	tgaggtcagg	agtttgagac	30720
	cagcctgacc	aaccggccaa	catggtgaaa	cacctctttt	acaaaaaaa	aaaaaaaaaa	30780
45	ttagcaaggc	gtggtggcac	gtgcctgtaa	tcccagctgg	tcggaaggct	gaggcatgag	30840
	aatccccctga	acttgggagg	cagaggttgc	agtgagctaa	gatcatgcc	ctgcactcca	30900
	gcctgggtga	cagaatgaga	ctcagtctaa	ataataataa	taataataat	aataataata	30960
	ataataataa	taaatagaat	agtggctcctg	tccccatcct	acttcagggt	accctgtcca	31020
	ttaggggattt	agtgcagtg	acagcaagtg	caaccacact	ggtttgagag	aaagagaact	31080
50	ggttcacaca	taacaaaaag	tccttctatg	ctgggctttg	gcgaggtctg	tcaatctctg	31140
	tcctaaggat	gcatggctcc	cctcctgtag	caagatggct	ggcagatacc	cctggggcca	31200
	gattcatatt	tgggggtgatt	aagattctgc	aagagagaga	caacctttat	ttcacacagc	31260
	ttttcaattg	ttgcctgtcc	ctggtgagac	tcggagacct	agctcttgcc	tggtttctaa	31320
	actttcaata	acaccgtttt	tgcttaagtc	agcacaacaa	gattttattt	cttgcaagca	31380
55	aagattcctg	aacaacaact	tcagagccgt	taacaatgag	gtcctgatca	caagctatgg	31440
	tataggacgt	gagaaatttg	tccttagcct	caatatctgc	tggagggcat	catggaataa	31500
	gtatttctat	cctctgatcc	ccactgtagg	gcacatggg	atatataatc	ctaaccctca	31560
	atctctgcca	tagagtttca	taggcaatgc	agtcctagcc	tcaatatgtt	gtaggggaatt	31620

atgggaaagg tgaattatc ctcaattata atacagagca tctcagaaaa tgcgttttta 31680
 gcctcatctc tgctgtaggg catcatggga gatatacttc tggcccaatt tttgtgttaa 31740
 gttgccatag aagatgcagt ctttccttcc ttcctttttt tcttttcttt ctttctttct 31800
 tttttttttt ttttattatg tagagacagg gtctctcgct atgttgccca ggctggctct 31860
 5 gaactcctgg gctcaagcag ttctcctgcc ttggcctccc aaagtgcctg gattacaggc 31920
 aagagccatt gcacccagtc cttctctctc tttctttctt catcacctgc catattccag 31980
 gcactaggaa taaatcatca agtaaaataaa cggccttacc ctccctggca attataatgg 32040
 ggaaagttag ctaaaaaaaa acaaaaatta ctgttccatt taacctcgc tgaataaaca 32100
 aataccccag aacgtagtgg tgtgaaacaa caacctttta attttatgat tctgtgagtc 32160
 10 aggaattgga gcaggattgg tgtgtatctg cttcatgatg aactggagcc aaaaatgaac 32220
 tagctggaac agctggagat ggagggggagg ggcatacagg gccatatatc taaggctggt 32280
 ggttggtggt gtgggttttg aatagtgtcc tccaagtaaa atatatgttg aagttctagc 32340
 ccctggatc tgtacatgtg accttatttg gaaataaaa ctttgcaaat gtaattcact 32400
 tttttgtttg tttgtttgtt tgctcgagac tgagtctcgc tctgtcacc aggctggagt 32460
 15 gcagtggcat gatctcggct cactgtgaac ttgctcctc gggttcaagc gattctcttg 32520
 cctcagcctc ccaagtagct gggattatag gcacgtgtca ccatgccag ctaattcttg 32580
 tattttcagt agggacgggg tttcaccatg ttggccaggc tggctctgaa ctctgacct 32640
 caaatgatct gccacctcag cctcccaaag tgctgggatt ataggcatgg ggcactgcat 32700
 cctgcccaga tgtgattaac ttctaaccctc tggatctctt gcatgtgact ttatttgga 32760
 20 ataagggtgg tttttttctt gttttttttt ttttttttga gacagtttca ctttgtcgct 32820
 caggctggag ttcagttgca taatctcagc tcaactgaac ctctgcctcc gaggtcagg 32880
 cgatcctccc gcctcagtct cccagtcac tgggactacg ggcaagcgcc accacaccg 32940
 gctaattgtt gcagtttttg tagagatggg gttttgccat gttgccagg cggctccca 33000
 ttgccaccct caagcaattc atccgcctcg gcctcccaga gtgctggaat tatagggtg 33060
 25 agccatggcg cccggccaga aagtctttgc agatttagtt gaattaatga ctaaattgtt 33120
 ccattgctgag ttagagtggg ctctaaatcc aatgattgat atgggggttat aaggagagat 33180
 atttggagac atagccacag tcccaggga ggtggacatt ggaagacaga ggtagggatt 33240
 agagtgtgag agctacaagc caaggaatgg caaagattgc tggcagtcct tcagaagcaa 33300
 aggagaggca aggaagggtt cttcccctga gactttttt tttttttttg agacggagtc 33360
 30 tcaactgctg cagcctcagc tggagtgcga tggcgcgatc tgggctcact gcaacctctg 33420
 cctcccagg tccagcaatt ctctgcctc agcctcccga gtaactgaga ttacaggcac 33480
 ccgccaccat gcctggctag tttttgcatt ttttagtagag atgggatttc accctgttg 33540
 ccaggctggt ctggaactcc tgacctcagg tgatccacct gcctcggcct cccaaagtgc 33600
 tgggattaca ggtgtcagcc cgggagactt taaaagcatg gctcttcccc tgacgttta 33660
 35 aaagcgtggc tcttccgtg agacttcaac accttgggtt tggacattta gcattcagaa 33720
 ctgtgagaga acaagtttct agtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg 33780
 tgtgtgtgta tgtgttttag acagaggctc attctgttgc ccaggctgga gtgcactggt 33840
 tcaatctcgg ctcaactgca actccgcttc tcagattcaa gtgattctta tgcctcagcc 33900
 tcccagtag ctggaattac agaggagcgc catcacagcc ggctattttt tttttttttt 33960
 40 tttgtacttt tagtagagac aggttttcac tgtgttgcc aggtgtgtct caaattcctg 34020
 gcctcaagt atagcctgc cttggcctcc caaagtgtg ggattacagg tgaagccac 34080
 cacacctggc ctaagtttct gtgtgtgtgt gtgtgtgttt tgtttgttt tttttttttt 34140
 tttgagtggg gtctcgctct gttgccagg ctggagtga gtggcatgat ctgcactcac 34200
 tgcaagctcc gcctcccggg ttacgacct tctcctgcct cagcctccc agtagctggg 34260
 45 actacaggca cccaccacca cgcccagtta attttttgta tttttaatag tgacagggtt 34320
 tcatcatgtt agccaggatg gtctcgatct cctgacctcg tgatccgcc gcctcagcct 34380
 cccgaattgc tgggattaca ggcattgagcc accaaacccg gccaaagtct tgtggtttta 34440
 agccaccttg cttgtaagat ttgtgtgtgt gtgtttttta ttttttatt ttaagtatta 34500
 tgaatacata atagtgtgt atatttacag gacatatgta atagtgtttt gggtttttagt 34560
 50 gttttttttt tggagacaga gtctggctct gttgccagg ctggagtaca gtggtgggat 34620
 catggctcac tgcagcctg acctcccgg tcaagggat cctcctgcct cagcctccca 34680
 tgtaactagg accacaggca tgccccacca catccagcca atttttttt atttttagt 34740
 gagatgaggt ctcaactgtt tgcccaggct gatctgaac tcctgagctc aagagatctt 34800
 cctttctcac cctcccaaag tgctaggact acaggcatga gccactgtgc ctgtccttcc 34860
 55 atgatgtttt gatataggca cacaatgtgt tagtttataa agtttgtaat aatttatcac 34920
 aggcagccct aggaaactaa tatagccaag tttcctgtt cttctctata tcacatctgc 34980
 tggggctaca tgtccaaggt ggcttcttca cccacttgtc tggtgccctg gctgagatgg 35040
 ctgaaacatc tggggctcta tctccacatg gcatttatac atgagtagct tgggcttctt 35100

cacagcatgg tggctctcagg gcagtagtac ttttacatgg caaccagctt cccagagtg 35160
 agcgttctaa gattcagaaa gtgaaaaatg aaagtttctt aaaacttggg tccagaacat 35220
 agcacagcaa aacttccacc acattctact ggtcaaagca gtcacagagt cactcatatt 35280
 caagaggcag aagtacagac ctacttctt taagccacta cagtgcacagg tggatgatg 35340
 5 tcattagaga aagccctaaa caagaacctt gtccctcacc tgcccccaaa taccatggaa 35400
 gatgtctttt tttttttttt tttttttttt gggatagtct cactgtgtca tgcagtggg 35460
 tgatc 35465

10 <210> 57
 <211> 14327
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

15 <400> 57
 ggccggcgag cggcgggctg cggcgggcgc ggagcgggag cgcgggagcg agcgagcgag 60
 agagcggcgc ggccggggcc atgggggtggc gggcgccggg cgcgctgctg ctggcgctgc 120
 tgctgcacgg gcggtgctg gcggtgaccc atgggctgag ggcatacgat ggcttgtctc 180
 tgctgagga catagagacc gtcacagcaa gccaaatgcg ctggacacat tctgacctt 240
 20 ctgatgatga gtacatgctg gctgacagca tctcaggaga cgacctgggc agtggggacc 300
 tgggcagcgg ggacttccag atggtttatt tccgagccct ggtgaatttc actcgctcca 360
 tcgagtacag ccctcagctg gaggatgcag gctccagaga gtttcgagag gtgtccgagg 420
 ctgtggtaga cagctggag tcggagtact tgaaaattcc cggagaccag gttgtcagt 480
 tgggtgttcat caaggagctg gatggctggg tttttgtgga gctcgatgtg ggctcggaa 540
 25 ggaatgcgga tgggtgctcag attcaggaga tgctgctcag ggatcatctc agcggctctg 600
 tggcctccta cgtcacctct cccagggat tccagttccg acgctgggc acagtgcccc 660
 agtccccaa agcctgcacg gagccgaggt ttgctgcca cagctacaat gagtgtgtg 720
 ccctggagta tcgctgtgac cggcgggccg actgcaggga catgtctgat gagtcaatt 780
 gtgaggagcc agtctgggt atcagcccca cattctctct ccttgtggag acgacatct 840
 30 taccgccccg gccagagaca accatcatgc gacagccacc agtcaccac gtcctcagc 900
 ccctgcttcc cgggtccgtc aggccctgc cctgtggg ccaggaggcc gcatgccgca 960
 atgggcactg catccccaga gactacctct gcgacggaca ggaggactgc gaggacggca 1020
 gcgatgagct agactgtggc ccccgccac cctgtgagcc caacgagttc ccctgcggga 1080
 atggacattg tgccctcaag ctgtggcgct gcgatgggtga ctttgactgt gaggaccgaa 1140
 35 ctgatgaagc caactgcccc accaagcgct ctgaggaaagt gtgcgggccc acacagtctc 1200
 gatgcgtctc taccaacatg tgcatcccag ccagcttcca ctgtgacgag gagagcgact 1260
 gtcctgaccg gagcgacgag tttggctgca tgcccccca ggtggtgaca cctccccggg 1320
 agtccatcca ggcttcccgg ggccagacag tgaccttcac ctgctggcc attggcgtcc 1380
 ccacccccat catcaattgg aggtcaact ggggccacat cccctctcat cccagggtga 1440
 40 cagtgaccag cgagggtggc cgtggcacac tgatcatccg tgatgtgaag gactcagacc 1500
 aggggtgccta cacctgtgag gccatgaacg cccggggcat ggtgtttggc attcctgacg 1560
 gtgtccttga gctcgtccca caacgaggcc cctgcccga cgccacttc tacctggagc 1620
 acagcgccgc ctgctgccc tgcttctgct ttggcatcac cagcgtgtgc cagagcacc 1680
 gccgcttccg ggaccagatc aggtgctgct ttgaccaacc cgatgacttc aagggtgtga 1740
 45 atgtgacaat gcctgcgcag cccggcacgc caccctctc ctccacgcag ctgcagatcg 1800
 acccatccct gcacgagttc cagctagtag acctgtccg ccgcttctc gtccacgact 1860
 ccttctgggc tctgctgaa cagttcctgg gcaacaagggt ggactcctat ggcggtccc 1920
 tgcgttaciaa cgtgcgtac gagttggccc gtggcatgct ggagccagt cagcgccgg 1980
 acgtggtcct cgtgggtgcc ggggtaccgc tctctccc aggccacaca cccaccaac 2040
 50 ctggtgctct gaaccagcgc caggtccagt tctctgagga gactgggtc catgagtctg 2100
 gccggccggg gcagcgcgcg gagctgctgc aggtgctgca gagcctggag gccgtgctca 2160
 tccagaccgt gtacaacacc aagatggcta gcgtgggact tagcgacatc gccatggata 2220
 ccaccgtcac ccatgccacc agccatggcc gtgcccacag tgtggaggag tgcatatgcc 2280
 ccattggcta ttctggcttg tctgcgaga gctgtgatgc ccacttact cgggtgctg 2340
 55 gtgggccta cctgggcacc tgctctggtt gcagttgcaa tggccatgcc agtctctgtg 2400
 accctgtgta tggccactgc ctgaattgac agcacaacac ggaggggcca cagtgaaca 2460
 agtgcaggc tggcttctt ggggacgcca tgaaggccac ggccacttc tggcgccct 2520
 gccctggccc atacatcgat gcctcccga gattctcaga cacttgcttc ctggacacgg 2580

atggccaagc cacatgtgac gcctgtgccc caggctacac tggccgcccg tgtgagagct 2640
 gtgcccccg atacgagggc aaccccatcc agcccgccg gaagtgcagg cccgtcaacc 2700
 aggagattgt gcgctgtgac gagcgtggca gcatggggac ctccggggag gcttgccgt 2760
 gtaagaacaa tgtggtgggg cgcttgtgca atgaatgtgc tgacggctct tccacactga 2820
 5 gtacccgaaa ccccgatggc tgcccaagt gcttctgcat ggggtgtagt cgccactgca 2880
 ccagctcttc atggagccgt gcccagttgc atggggcctc tgaggagcct ggtcacttca 2940
 gcctgaccaa cgccgcaagc acccacacca ccaacgagg catcttctcc cccacgccc 3000
 gggaaactggg attctctctc tccacagac tcttatctgg accctacttc tggagcctcc 3060
 cttcacgctt cctgggggac aagggtgacct cctatggagg agagctgctc ttcacagtga 3120
 10 cccagaggtc ccagccgggc tccacacccc tgcacgggca gccgttggtg gtgctgcaag 3180
 gtaacaacat catcctagag caccatgtgg cccaggagcc cagccccggc cagcccagca 3240
 ccttcattgt gcctttccgg gagcaagcat ggcagcggcc cgatgggag ccagccacac 3300
 gggagcacct gctgatggca ctggcaggca tgcacaccct cctgatccga gcacccactg 3360
 cccagcagcc cgctgagagc aggtctctct cactcagcat ggacgtggct gtgcccagg 3420
 15 aaaccggcca ggaccccgcg ctggaagtgg aacagtgtc ctgcccaccc ggggtaccgtg 3480
 ggccgtcctg ccaggactgt gacacaggct acacacgcac gccagtgcc ctctacctgg 3540
 gtacctgtga acgctgcagc tgccatggcc actcagagg ctgcgagcca gaaacaggtg 3600
 cctgccaggg ctgccagcat cacacggagg gccctcgggtg tgagcagtgc cagccaggat 3660
 actacgggga cgcccagcgg gggacaccac aggactgcca gctgtgcccc tgctacggag 3720
 20 accctgtctc cgccaggct gccacactt gttttctgga cacagacggc caccacact 3780
 gtgatgcgtg ctcccaggc cactgtggc gtcactgtga gagggtgcgc cctggctact 3840
 atggcaaccc cagccagggc cagccatgcc agagagacag ccaggtgcca gggcccatag 3900
 gctgcaactg tgaccccaa ggcagcgtca gcagccagt tgatgctgct ggtcagtgc 3960
 agtgcaaggc ccaggtagaa ggcctcact gcagccact cgggccccc cacttccacc 4020
 25 tgagtgccag caaccagac ggctgcctgc cctgctctc tatgggcatc acccagcagt 4080
 gcgccagctc tgctacaca cgccacctga tctccacca ctttgccct ggggacttcc 4140
 aaggctttgc cctggtgaac ccacagcga acagccgct gacaggagaa ttcactgtgg 4200
 aaccgctgcc cgagggtgcc cagctctctc ttggcaact tgcccaact ggccatgagt 4260
 ccttctactg cgagctgcc gagacatac agggagacaa ggtggcggcc tacggtggga 4320
 30 agttgcgata caccctctc tacacagcag gccacaggg cagccactc tcggacccc 4380
 atgtgcagat cacgggcaac aacatcatgc tagtggcct ccagccagc ctgcagggcc 4440
 cagagaggag gagctacgag atcatgttcc gagaggaatt ctggcggcc cccgatggg 4500
 agccggccac acgagagcac ctctgatgg cactggccga cctggatgag ctctgatcc 4560
 gggccacgtt ctctccgtg ccgctggtgg ccagcatcag cgagtcagc ctggaggtcg 4620
 35 cccagccgg gccctcaaac agcccccg ccctcagggt ggaggagtgc cgctgcccgc 4680
 caggctacat cggtctgtcc tgccaggact tgcccccg ctacacgcgc accggagtc 4740
 ggctctacct cgccactgc gagctatgt aatgcaatgg ccactcagac ctgtgccacc 4800
 cagagactgg ggcctgctc caatgccagc acaacgcgc aggggagttc tgcgagctt 4860
 gtgcccctg ctactacgga gatgccacag ccgggacgc tgaggactgc cagccctgtg 4920
 40 cctgcccact gaccaacca gagaacatgt tttccgcac ctgtgagagc ctgggagccg 4980
 gcgggtaccg ctgcacggcc tgcaaaccc gctacactgg ccagtactgt gagcagtgtg 5040
 gccaggtta cgtgggtaac ccagtggtgc aagggggcca gtgcctgcca gagacaaacc 5100
 aagcccccact ggtggtcgag gtccatctc ctggaagcat agtgcaccaa ggtggctccc 5160
 actccctgcg gtgtcaggtc agtgggagcc cactccacta cttctattgg tccgtgagg 5220
 45 atgggcccgc tgtgcccagc ggacccagc agcgacatca aggtccgag ctccacttcc 5280
 ccagcgtcca gccctcgat gctggggtct acatttgcac ctgccgtaat ctccaccaat 5340
 ccaataccag ccgggcagag ctgctggtca ctgaggctcc aagcaagccc atcacagtga 5400
 ctgtggagga gcagcggagc cagagcgtgc gcccggagc tgacgtcacc ttcactgca 5460
 cagccaaaag caagtccca gcctataccc tgggtgtggac ccgctgcac aacgggaaac 5520
 50 tgcccccag agccatggat ttcaatggca tcctgacctc tcgcaacgtc cagctgagt 5580
 atgcaggcac ctacgtgtgc accggtcca acatgtttgc catggaccag ggcacagcca 5640
 ctctacatgt gcaggcctc ggacacttgt ccgccccgt ggtctccatc catccgccac 5700
 agctcacagt gcagcccgcc caactggcgg agttccgtg cagcgccaca gggagcccca 5760
 cgccaccct cgagtggaca gggggcccc gcggccagct ccctgcgaag gcacaaatcc 5820
 55 acggcggcat cctgcgcctg ccagctgtcg agcccacgga tcaggcccag tacttgtgcc 5880
 gagcccacag cagcgtggg cagcagggtg ccagggtgt gctccacgtc catggggggc 5940
 gtgggcccag agtccaagt agcccagaga ggaccaggt ccacgcaggc cggaccgtca 6000
 ggctgtactg cagggtgca ggcgtgcta gcgccacct cacctggagg aaggaaggg 6060

gcagcctccc accacaggcc cggtcagagc gcacagacat cgcgacactg ctcatcccag 6120
 ccatcacgac tgctgacgcc ggcttctacc tctgctggc caccagccct gcaggcactg 6180
 cccaggcccg gatgcaagtg gttgtccttt cagcctcaga tgccagccca ccgggggtca 6240
 agattgagtc ctcatcgctt tctgtgacag aaggggaaaac actcgacctc aactgtgtgg 6300
 5 tggcagggtc agcccattgcc caggtcacct ggtacaggcg agggggtagc ctgcctcccc 6360
 acacccaggt gcacgggtcc cgtctgcggc tccccagggt ctacccagct gattctggag 6420
 aatatgtgtg ccgtgtggag aatggatcgg gccccaaagg ggctccatt actgtgtctg 6480
 tgctccacgg caccatttct ggccccagct acacccaggt gccgggcagc acccggccca 6540
 tccgcatcga gccctcctcc tcacacgtgg cgggaaggga gacctggat ctgaactgcg 6600
 10 tgggtgcccgg gcaggccccc gcccagggtca cgtggcacaa gcgtggggggc agcctccctg 6660
 cccggcacca gacccacggc tcgctgtctg ggtgaccaa ggtgaccccg gccgactcag 6720
 gcgagtatgt gtgccatgtg gtgggcacct ccggccccct agaggcctca gtcctgggtc 6780
 ccatcgaagc ctctgtctatc cctggaccca tcccacctgt caggatcgag tcttcatcct 6840
 ccacagtggc cgagggccag accctggatc tgagctgcgt ggtggcaggg caggccacg 6900
 15 cccagggtcac atggtacaag cgtgggggca gcctccctgc ccggcaccag gttcgtggct 6960
 cccgcctgta catcttccag gcctcacctg ccgatgcggg acagtacgtc tgccgggcca 7020
 gcaacggcat ggaggcctcc atcacgggtca cagtaactgg gacccagggg gccaacttag 7080
 cctacctgc cggcagcacc cagcccatcc gcacgagcc ctctcctcg caagtggcgg 7140
 aagggcagac cctggatctg aactgcgtgg tgccgggca gtcccatgcc caggtcacgt 7200
 20 ggcacacagc tgggggcagc ctccctgtcc gcaccagac ccacggctcc ctgtcgagc 7260
 tctaccaagc gtcccccgcc gactcgggcg agtacgtgtg ccgagtgtt ggcagctccg 7320
 tgctctaga ggctctgtc ctggtcacca ttgagcctgc gggctcagtg cctgcacttg 7380
 gggtcacccc caggttcgg atcgagtcac cgtcttcgca agtggccgag gggcagaccc 7440
 tggacctgaa ctgcctcgtt gctggtcagg cccatgccca ggtcacgtgg cacaagcgcg 7500
 25 ggggcagcct cccggcccgg caccagggtc atggctcgag gctacgcctg ctccagggtga 7560
 cccagctga ttcaggggag tacgtgtgcc gtgtggctcg cagctcaggt acccaggaag 7620
 cctcagtcct gtccaccatc cagcagcgcc ttagtggctc ccactccag ggtgtggcgt 7680
 acccgtccg catcgagtcc tctcagcct ccctggccaa tggacacacc ctggacctca 7740
 actgctggt tgccagccag gctccccaca ccatcacctg gtataagcgt ggaggcagct 7800
 30 taccagccg gcaccagatc gtgggtccc ggctgcggat ccctcaggtg actccggcag 7860
 actcgggcga gtacgtgtgt cacgtcagta acggtgcagg ctcccgggag acctcgctca 7920
 tcgtcaccat ccagggcagc ggttctctcc acgtgccag cgtctccca ccgatcagga 7980
 tcgagtcgtc tccccccag gtggtggaag ggcagacctt ggatctgaac tgcgtggctg 8040
 ccaggcagcc ccaggctatc atcacatggt acaagcgtgg gggcagcctt cctcccgac 8100
 35 accagaccca tggctccac ctgcggttgc accaaatgtc tgtggctgac tcgggcgagt 8160
 atgtgtgccg ggccaacaac aacatcgatg ccctggaggc ctccatcgct atctcgtct 8220
 cccctagcgc cggcagcccc tccgcccctg gcagctccat gccatcaga attgagtcac 8280
 cctctcaca cgtggccgaa ggggagaccc tggatctgaa ctgctgggtc cccgggcagg 8340
 cccatgccca ggtcacttg cacaagcgtg ggggcagcct cccagtcac catcagaccc 8400
 40 gcggctcacg gctgcggctg caccatgtgt ccccgccga ctccgggtgaa tacgtgtgcc 8460
 ggggtgatgg cagctctggc cccctggagg cctcagtcct ggtcaccatc gaagcctctg 8520
 gctcaagtgc tgtccacgtc cccgcccag gtggagcccc acccatccgc atcgagccct 8580
 cctctctccg agtggcagaa gggcagaccc tggatctgaa gtgcgtggtg cccgggcagg 8640
 cccacgcccc ggtcacatgg cacaagcgtg gaggaacct cctgcccgg caccaggctc 8700
 45 acggcccaact gctgaggctg aaccagggtg ccccggtga ctctggcgag tactcgtgcc 8760
 aagtgaacgg aagctcaggc accctggagg catctgtcct ggtcacaatt gagccctcca 8820
 gcccaggacc cattcctgct ccaggactgg cccagccat ctacatcgag gcctcctctt 8880
 cacacgtgac tgaaggcgag actctggatc tgaactgtgt ggtgcccggg caggcccatg 8940
 cccaggtcac gtggtacaag cgcgggggca gcctccccgc ccggcaccag acccatggct 9000
 50 cccagctgcg gctccacctc gtctccccg ccgactcagg cgagtatgtg tgtcgtgcag 9060
 ccagcggccc aggccttgag caagaagcct ccttcacagt caccgtccc cccagtggag 9120
 ggtcttctta ccgcttagg agcccgtca tctccatcga cccgcccagc agcaccgtgc 9180
 agcagggcca ggtgccagc ttcaagtgc tcattccatga cggggcagcc cccatcagcc 9240
 tcgagtggaa gacccggaac caggagctgg aggacaacgt ccacatcagt cccaatggct 9300
 55 ccatcatcac catcgtgggc acccggccca gcaaccacgg tacctaccgc tgcgtggcct 9360
 ccaatgccta ccgtgtggc cagagtgtgg tgaacctcag tgtgcacggg cccctacag 9420
 tgtccgtgct ccccgaggcc cccgtgtggg tgaagtggg aaaggctgtc acctgtgagt 9480
 gtgtcagtg cggggagccc cgtcctctg ctctgtggac ccggatcagc agcaccctg 9540

ccaagttgga gcagcggaca tatgggctca tggacagcca cgcgggtgctg cagatttcat 9600
 cagctaaacc atcagatgcg ggcacttatg tgtgccttgc tcagaatgca ctaggcacag 9660
 cacagaagca ggtggaggtg atcgtggaca cgggcgccat ggccccaggg gcccctcagg 9720
 tccaagctga agaagctgag ctgactgtgg aggctggaca cacggccaac ttgcgctgct 9780
 5 cagccacagg cagccccgcg cccaccatcc actggtccaa gctgcgttcc ccactgccct 9840
 ggcagcaccg gctggaaggc gacacactca tcataccccg ggtagcccag caggactcgg 9900
 gccagtacat ctgcaatgcc actagccctg ctgggcacgc tgaggccacc atcatcctgc 9960
 acgtggagag cccaccatat gccaccacgg tcccagagca cgcttcggtg caggcagggg 10020
 agacggtgca gctccagtgc ctggctcacg ggacaccccc actcaccttc cagtggagcc 10080
 10 gcggtgggcag cagccttctt gggagggcga ccgccaaggaa cgagctgctg cactttgagc 10140
 gtgcagcccc tgaggactca ggcgcgtacc gctgcgggtg caccaacaag gtgggtcag 10200
 ccgaggcctt tgcccagctg ctgctccaag gccctccccg ctctctccct gccacctcca 10260
 tcccagcagg gtccacgccc accgtgcagg tcacgcctca gctagagacc aagagcattg 10320
 gggccagcgt tgagtccac tgtgctgtgc ccagcgacca gggtagccag ctccgttgg 10380
 15 tcaaggaagg gggctcagctg cctccgggtc acagcgtgca ggatgggggtg ctccgaatcc 10440
 agaacttggg ccagagctgc caagggacgt atatatgcca ggccccatgga ccttggggga 10500
 agggccaggc cagtgcaccg ctggttatcc aagccctgcc ctcggtgctc atcaacatcc 10560
 ggacctctgt gcagaccgtg gtggttggcc acgcccgtgga gttcgaatgc ctggcactgg 10620
 gtgacccccaa gcctcaggtg acatggagca aagttggagg gcacctgagg ccaggcattg 10680
 20 tgcagagcgg aggtgtcgtc aggatgcgcc cagtagagct ggctgatgag ggacagtatc 10740
 gctgcactgc caccaacgca gctggcacca cacaatccca cgtcctgctg cttgtgcaag 10800
 ccttgcccca gatctcaatg ccccaagaag tccgtgtgcc tgctgggttct gcagctgtct 10860
 tccccctgcat agcctcaggc taccctactc ctgacatcag ctggagcaag ctggatggca 10920
 gcctgccacc tgacagccgc ctggagaaca acatgtgat gctgccctca gtccgacccc 10980
 25 aggacgcagg tacctacgtc tgcaccgcca ctaaccgcca gggcaagggtc aaagcctttg 11040
 cccacctgca ggtgccagag cgggtggtgc cctacttcac gcagaccccc tactccttcc 11100
 taccgctgcc caccatcaag gatgcctaca ggaagttcga gatcaagatc accttccggc 11160
 ccgactcagc cgatgggatg ctgctgtaca atgggcagaa gcgagtccca gggagcccca 11220
 ccaacctggc caaccggcag cccgacttca tctccttcgg cctcgtgggg ggaaggcccg 11280
 30 agttccgggtt cgatgcaggc tcaggcatgg ccaccatccg ccatccaca cactggccc 11340
 tgggccattt ccacaccgtg accctgctgc gcagcctcac ccagggtccc ctgattgtgg 11400
 gtgacctggc cccggtcaat gggacctccc agggcaagtt ccagggcctg gatctgaacg 11460
 aggaactcta cctgggtggc tatcctgact atggtgccat ccccaaggcg gggctgagca 11520
 gcggcttcat aggtgtgtc cgggagctgc gcatccaggg cgaggagatc gtcttccatg 11580
 35 acctcaacct caccggcac ggcactctcc actgcccac ctgtcgggac cggccctgcc 11640
 agaatggcgg tcagtccat gactctgaga gcagcagcta cgtgtgcgtc tgcccagctg 11700
 gcttcaccgg gagccgtgt gagcactcgc aggcctgca ctgccatcca gaggcctgtg 11760
 ggcccagcgc cactgtgtg aaccggcctg acggtcgagg ctacacctgc cgctgccacc 11820
 tgggcccgtc ggggttgagg tgtgaggaag gtgtgacagt gaccaccccc tcgctgtcgg 11880
 40 gtgctggctc ctacctggca ctgcccgcgc tcaccaaacac acaccacgag ctacgctgg 11940
 acgtggagtt caagccactc gcccctgacg gggctcctgt gttcagcggg ggggaagagcg 12000
 ggctgtgga ggacttcgtg tccctggcga tgggtggcgg ccacctggag ttccgctatg 12060
 agttggggtc agggctggcc gttctgcgga gcgccgagcc gctggccctg ggcgctggc 12120
 accgtgtgtc tgcagagcgt ctcaacaagg acggcagcct gcgggtgaat ggtggacgccc 12180
 45 ctgtgctgcg ctctcgcgc ggcaagagcc agggcctcaa cctgcacacc ctgctctacc 12240
 tggggggtgt ggagccttcc gtgccactgt ccccgccac caacatgagc gctcacttcc 12300
 gcggctgtgt gggcgagggt tcagtgaatg gcaaacggct ggacctcacc tacagtttcc 12360
 taggcagcca gggcatcggg caatgctatg atagctcccc atgtgagcgc cagccttgcc 12420
 aacatggtgc cagtgcatg cccgctggcg agtatgagtt ccagtgcctg tgtcgagatg 12480
 50 gattcaaaag agacctgtg gagcacgag agaaccctg ccagctccgt gaaccctgtc 12540
 tgcattgggg cacttgcag ggcacccgct gcctctgctt cctggccttc tctggccacc 12600
 gctgccaaca aggtcttggc catggcatag cagagtccga ctggcatctt gaaggcagcg 12660
 ggggcaatga tgcccctggg cagtacggag cctatttcca cgatgatggc ttccctcgct 12720
 tccctggcca tgtcttctcc aggagcctgc ccgaggtgcc cgagaccatc gagctggagg 12780
 55 ttccggaccag cacagccagt ggcctcctgc tctggcaggg tgtggagggt ggagaggccg 12840
 gccaaggcaa ggacttcac agcctcgggc ttcaagacgg gcaccttgtc ttcagggtacc 12900
 agctgggtag tgggaggcc cgcctggtct ctgaggaccc catcaatgac ggcgagtgcc 12960
 accgggtgac agcactgagg gagggcccga gaggttccat ccaagtgcac ggtgaggagc 13020


```

    tggtcagcgg ccggtcccca ggtcccaacg tggcagtc aa cgccaagggc agcgtctaca 13080
    tcggcgggagc ccctgacgtg gccacgctga ccggggggcag attctcctcg ggcacacag 13140
    gctgtgtcaa gaacctgggtg ctgcactcgg cccgaccg cgccccgccc ccacagcccc 13200
    tggacctgca gcaccgcgcc caggccgggg ccaacacacg cccctgcccc tcgtaggcac 13260
5    ctgcctgccc cacacggact cccggggcac gccccagccc gacaatgtcg agtatattat 13320
    tattaatatt attatgaatt tttgtaagaa accgaggcga tgccacgctt tgctgctacc 13380
    gccctgggct ggactggagg tgggcatgcc accctcacac acacagctgg gcaaagccac 13440
    aaggctggcc agcaaggcag gttggatggg agtgggcacc tcagaaagtc accaggactt 13500
    ggggtcagga acagtggctg ggtgggcccc gaactgcccc cactgtcccc ctaccaccg 13560
10   atggagcccc cagatagagc tgggtggcct gtttctgcag cccttgggca gttctcactc 13620
    ctaggagagc caacctcggc ttgtgggctg gtgccccaca gctacctgag acgggcatcg 13680
    caggagtctc tgccaccac ctaggattcg gaattgtctt tagtgccggc tgtggagcaa 13740
    aaggcagctc acccctgggc aggcgggtccc catccccacc agctcgtttt tcagcacc 13800
    caccacctc caccagccc ctggcacctc ctctggcaga ctccccctcc taccacgtcc 13860
15   tcctggcctg cattcccacc ccctcctgcc agcacacagc ctgggggtccc tccctcaggg 13920
    gctgtaaggg aaggcccacc ccaactctta ccaggagctg ctacaggcag agcccagcac 13980
    tgatagggcc ccgcccaccg ggccccgccc accccaggcc acatccccac ccatctggaa 14040
    gtgaaggccc agggactcct ccaacagaca acggacggac ggatgccgct ggtgctcagg 14100
    aagagctagt gccttaggtg ggggaaggca ggactcacga ctgagagaga gaggaggggg 14160
20   atatgaccac cctgccccat ctgcaggagc ctgaagatcc agctcaagtg ccatcctgcc 14220
    agtggccccc agactgtggg gttgggacgc ctggcctctg tgcctagaa gggaccctcc 14280
    tgtggtcttt gtcttgattt ttcttaataa acggtgctat ccccgcc 14327

25   <210> 58
    <211> 15
    <212> PRT
    <213> Homo sapiens

30   <400> 58
    Ile Pro Thr Gly Glu Pro Cys Pro Glu Pro Leu Arg Thr Tyr Gly
        1             5             10             15

35   <210> 59
    <211> 13
    <212> PRT
    <213> Homo sapiens

40   <400> 59
    Ile Glu Ser Val Leu Ser Ser Ser Gly Lys Arg Leu Gly
        1             5             10

45   <210> 60
    <211> 18
    <212> PRT
50   <213> Homo sapiens

    <400> 60
    Ala Thr Pro Ala Gln Ala His Leu Lys Lys Pro Ser Gln Leu Ser Ser
        1             5             10             15

55   Phe Ser

```

<210> 61
 <211> 15
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 61
 Arg Ile Gln Ala Met Ile Pro Lys Gly Ala Leu Arg Val Ala Val
 10 1 5 10 15

 <210> 62
 15 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 62
 20 Gly Ile Cys Gln Cys Leu Ala Glu Arg Tyr Ser Val Ile Leu Leu
 1 5 10 15

 <210> 63
 25 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 63
 30 Glu Lys Met His Glu Gly Asp Glu Gly Pro Gly His His His Lys Pro
 1 5 10 15
 Gly
 35

 <210> 64
 40 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 64
 45 Asp Leu Gln Asn Phe Leu Lys Lys Glu Asn Lys Asn Glu
 1 5 10

 <210> 65
 50 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 65
 55 Val Lys Leu Gly His Pro Asp Thr Leu Asn Gln Gly Glu Phe Lys Glu
 1 5 10 15

Leu Val Arg

5
 <210> 66
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10
 <400> 66
 ttywsntggg ayaaytgytt ygarggnaar gayccngcng tnathmgn 48

15
 <210> 67
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

20
 <400> 67
 taywsnytn cnaarwsnga rttygcngtn ccngayytng arytnccn 48

25
 <210> 68
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30
 <400> 68
 Phe Ser Trp Asp Asn Cys Phe Glu Gly Lys Asp Pro Ala Val Ile Arg
 1 5 10 15

35
 <210> 69
 <211> 585
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

40
 <400> 69
 gaygcncng gncartaygg ngcntaytty caygaygayg gnttyytngc nttyccnggn 60
 caygtnttyw snmgnwsnyt nccngargtn ccngaracna thgarytn ga rgtnmgnacn 120
 wsnacngcnw snggnytnyt nytntggcar ggngtngarg tnggngargc nggncarggn 180
 aargayttya thwsnytnng nytnccargay ggncayytng tnttymgnta ycarytnngn 240
 45 wsnngngarg cnmgnytngt nwsngargay ccnathaayg ayggngartg gcaymgngtn 300
 acngcnytnm gngarggnmg nmngngnwsn mgncargtn ayggngarga rytngtnwsn 360
 ggnmgwnsnc cnggnccnaa ygtngcngtn aaygcnaarg gnwsngnta yathggnggn 420
 gcncngayg tngcnacnyt nacngnggn mgnttywsnw snggnathac nggntgygt 480
 aaraayytng thytncayws ngcnmgncn ggngcncnc cncncarcc nytngayyt 540
 50 carcaymgng cncargcng ngcnaayacn mgncntgyc cnwsn 585

55
 <210> 70
 <211> 597
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 70

atgaartggg tntgggcnyt nytnytnytn gcngcntggg cngcngcnga rmngaytgy 60
 mngntnwnsw snttymngnt naargaraay ttygayaarg cnmgnttyws nggnacntgg 120
 taygcnatgg cnaaraarga yccngarggn ytnttytnc argayaayat hgtngcngar 180
 ttywsngtng aygaracngg ncaratgwsn gcnacngcna arggnmgnt nmgnynytn 240
 5 aayaaytggg aygtntgygc ngaytggtg ggnacnttya cngayacnga rgayccngcn 300
 aarttyaara tgaartaytg gggngtngcn wsnttytnc araarggnaa ygaygaycay 360
 tggathgtng ayacngayta ygayacntay gcngtncart aywsntgymg nytnytnaay 420
 ytngayggna cntgygcnga ywsntaywsn ttygtnttyw snmgngaycc naayggnytn 480
 ccncngarg cncaraarat hgtnmngncar mgncargarg aryntgyt ngcnmgncar 540
 10 taymgnytna thgtncayaa yggntaytgy gayggnmgw sngarmgnaa yytnytn 597

<210> 71
 <211> 579
 15 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 71
 atgcarwsny tnatgcargc nccnytnytn athgcnytng gnytnytnyt ngcnacnccn 60
 20 gcncargcnc ayytnaaraa rccnwsncar ytnwsnwsnt tywsntggga yaaytgytty 120
 garggnaarg ayccngcngt nathmgwnsn ytnacnytn arcngaycc nathgtngtn 180
 ccnggnaayg tnacnytnws ngtngtnggn wsnacnwsng tnccnytnws nwsnccnytn 240
 aargtngayy tngtntnga raargargtn gcnggnytn ggathaarat hccntgyacn 300
 gaytayathg gnwsntgyac nttygaray ttytgygay tnytngayat gytnathccn 360
 25 acnggngarc cntgyccnga rccnytnmgn acntayggny tnccntgyca ytgycntty 420
 aargarggna cntaywsnyt nccnaarwsn garttygcng tnccngayt ngarytnccn 480
 wsntggytna cnacnggnaa ytaymgnath garwsngtny tnwsnwsnws nggnaarmgn 540
 ytnggntgya thaarathgc ngcnwsnytn aarggnath 579

30
 <210> 72
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

35
 <400> 72
 Tyr Ser Leu Pro Lys Ser Glu Phe Ala Val Pro Asp Leu Glu Leu Pro
 1 5 10 15

40
 <210> 73
 <211>
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

45
 <400> 73

50
 MQSLMQAPLL IALGILLATP AQAHKKPSQ
 LSSFWDNCD EGKDPVIRS LTLEDPVV
 PGNVTLVVG STSVPLSSPL KVDLVLEKEV
 AGLWIKIPCT DYIGSCTFEH FCDVLDMLIP
 TGEPCPEPLR TYGLPCHCPF KEGTYSLPKS
 EFVVPDELP SWLTTGNYRI ESVLSSSGKR
 LGCIKIAASLKI

55

<210> 74
<211>
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5

<400> 74

10

GDVCQDCIQM VTDIQTAVRT NSTFVQALVE HVKEECDRLG PGMADICKNY ISQYSEIAIQ MMMHHMQDQQP KEICALVGFC DEV
--

15

<210> 75
<211>
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20

<400> 75

25

MTCKMSQLER NIETIINTFH QYSVKLGHPD
TLNQGEFKEL VRKDLQNFLK KENKNEKVIE
HIMEDDLDTN ADKQLSFEEF IMLMARLTWA
SHEKMHEGDE GPGHHHKPGL GEGTP

30

35

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
25 janvier 2001 (25.01.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 01/05422 A3

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
G01N 33/68, 33/564, C07K 14/47, A61K 38/17

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR00/02057

(22) Date de dépôt international : 17 juillet 2000 (17.07.2000)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
99/09372 15 juillet 1999 (15.07.1999) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :
BIOMERIEUX STELHYS [FR/FR]; Chemin de
L'Orme, F-69280 Marcy L'Etoile (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : **ROECK-
LIN, Dominique** [FR/FR]; 14 Rue de la Paix, F-67500
Niederschaeffolsheim (FR). **KOLBE, Hanno** [FR/FR]; 6

Rue des Tuilliers, F-67204 Achenheim (FR). **CHARLES,
Marie-Hélène** [FR/FR]; 3 Allée de la Lamperte, F-69420
Condrieu (FR). **MALCUS, Carine** [FR/FR]; 9 Rue des
Ronzières, F-69530 Brignais (FR). **SANTORO, Lyse**
[FR/FR]; 47 Avenue Bergeron, F-69260 Charbonnières les
Bains (FR). **PERRON, Hervé** [FR/FR]; 15 Rue de Boyer,
F-69005 Lyon (FR).

(74) Mandataire : **DIDIER, Mireille**; Cabinet Germain et
Maureau, Boîte Postale 6153, F-69466 Lyon Cedex 06
(FR).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE,
DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, NO,
NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: USE OF A POLYPEPTIDE FOR DETECTING, PREVENTING OR TREATING A PATHOLOGICAL CONDITION
ASSOCIATED WITH A DEGENERATIVE, NEUROLOGICAL OR AUTOIMMUNE DISEASE

(54) Titre : UTILISATION D'UN POLYPEPTIQUE POUR DETECTER, PREVENIR OU TRAITER UN ETAT PATHOLOGIQUE
ASSOCIE A UNE MALADIE DEGENERATIVE, NEUROLOGIQUE AUTOIMMUNE

(57) Abstract: The invention concerns the use of at least one polypeptide comprising a protein fragment to obtain a diagnostic, prognostic, prophylactic or therapeutic composition for detecting, preventing or treating a pathological condition associated with a degenerative and/or neurological and/or autoimmune disease, said protein being selected among the proteins whereof the peptide sequence in native state corresponds to SEQ ID No 1, SEQ ID No 2, SEQ ID No 3, SEQ ID No 4, SEQ ID No 5, SEQ ID No 6, SEQ ID No 7, SEQ ID No 8, SEQ ID No 9, SEQ ID No 10, SEQ ID No 11, SEQ ID No 12, SEQ ID No 13, SEQ ID No 14, SEQ ID No 15, SEQ ID No 16, SEQ ID No 17, SEQ ID No 18, SEQ ID No 19, SEQ ID No 20, SEQ ID No 21, SEQ ID No 22, SEQ ID No 23, SEQ ID No 24, SEQ ID No 25, SEQ ID No 26, SEQ ID No 27, SEQ ID No 28 and SEQ ID No 29, and the peptide sequences having at least 70 % identity, preferably at least 80 % identity and advantageously at least 98 % identity with any one of the peptide sequences SEQ ID No 1 to SEQ ID No 8 and SEQ ID No 10 to SEQ ID No 29, and the peptide sequences or fragments of said sequences belonging to a common family of proteins selected among perlecan, the precursor of the retinol-binding plasmatc protein, of the precursor of the activator of GM2 ganglioside, of calgranulin B and of saposin B.

(57) Abrégé : Utilisation d'au moins un polypeptide comprenant au moins un fragment d'une protéine pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29, et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à SEQ ID N° 8 et SEQ ID N° 10 à SEQ ID N° 29, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B.

WO 01/05422 A3



MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

Publiée :

-- avec rapport de recherche internationale

(88) Date de publication du rapport de recherche internationale:

28 février 2002

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/02057

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G01N33/68 G01N33/564 C07K14/47 A61K38/17

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS, WPI Data, PAJ, EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 876 954 A (DOBRANSKY TOMAS ET AL) 2 March 1999 (1999-03-02) column 28; claim 17 & EP 0 667 354 A 16 August 1995 (1995-08-16) claim 5 & WO 95 21859 A cited in the application ---	1-21, 40, 51-62
X	WO 97 33466 A (BIO MERIEUX ; RIEGER FRANCOIS (FR); PERRON HERVE (FR); BENJELLOUN N) 18 September 1997 (1997-09-18) cited in the application claims --- -/--	1-21, 40, 51-62



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

8 document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 January 2001

Date of mailing of the international search report

08.02.2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hoekstra, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 00/02057

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 08 308582 A (KAO CORP) 26 November 1996 (1996-11-26) the whole document ----	23
A	RIEGER F ET AL: "UN FACTEUR GLIOTOXIQUE ET LA SCLEROSE EN PLAQUES GLIOTOXICITY IN MULTIPLE SCLEROSIS" COMPTES RENDUS DES SEANCES DE L'ACADEMIE DES SCIENCES. SERIE III: SCIENCES DE LA VIE,NL,ELSEVIER, AMSTERDAM, vol. 319, no. 4, 1 April 1996 (1996-04-01), pages 343-350, XP000602023 ISSN: 0764-4469 abstract ----	1-21,40, 51-62
A	KISILEVSKY R ET AL: "ARRESTING AMYLOIDOSIS IN VIVO USING SMALL-MOLECULE ANIONIC SULPHONATES OR SULPHATES: IMPLICATIONS FOR ALZHEIMER'S DISEASE" NATURE MEDICINE,US,NATURE PUBLISHING, CO, vol. 1, no. 2, 1 February 1995 (1995-02-01), pages 143-148, XP000611547 ISSN: 1078-8956 the whole document ----	1-21,40, 51-62
A	WO 90 07712 A (BISSENDORF PEPTIDE GMBH) 12 July 1990 (1990-07-12) page 2 ----	1-21,40, 51-62
A	WO 98 11439 A (BIO MERIEUX ;PERRON HERVE (FR); MALCUS VOCANSON CARINE (FR); MANDR) 19 March 1998 (1998-03-19) the whole document ----	1-21,40, 51-62
A	CA 2 214 843 A (HSC RESEARCH AND DEVELOPMENT LIMITED PARTNERSHIP, CA) 30 April 1999 (1999-04-30) the whole document -----	1-63

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See additional sheet

After review as per PCT Rule 40.2(e), no fee is to be refunded.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

22-39 (completely); 1-21, 40-63 (partly)

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims: it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.



No protest accompanied the payment of additional search fees.

The International Searching Authority found several (groups of) inventions in the international application, namely:

1. Claims: 1-21, 40, 51-62 (partly)

Perlecan polypeptides involved in diagnostic, prognostic, prophylactic or therapeutic methods (For example: SEQ ID No. 1, 2, 69).

2. Claims: 1-21, 40, 51-63 (partly)

Polypeptides precursor of the retinol-binding plasmatic protein involved in diagnostic, prognostic, prophylactic or therapeutic methods (For example: SEQ ID No. 4, 5, 6, 7, 30, 70).

3. Claims: 22-39 (completely); 1-21, 40-63 (partly)

Polypeptides precursor of the GM2 ganglioside involved in diagnostic, prognostic, prophylactic or therapeutic methods (For example: SEQ ID No. 8-16, 66-68, 72).

4. Claims: 1-21, 40-44, 46-63 (partly)

Polypeptides calgranulin B involved in diagnostic, prognostic, prophylactic or therapeutic methods (For example: SEQ ID No. 17-23, 43-52).

5. Claims: 1-21, 40-63 (partly)

Polypeptides saposin B involved in diagnostic, prognostic, prophylactic or therapeutic methods (For example: SEQ ID No. 24-29, 53-55).

6. Claim: 64

Use of lycorin.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/02057

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5876954 A	02-03-1999	FR 2716198 A	18-08-1995
		AU 701972 B	11-02-1999
		AU 1815295 A	29-08-1995
		CA 2142557 A	16-08-1995
		EP 0667354 A	16-08-1995
		FI 954876 A	13-10-1995
		WO 9521859 A	17-08-1995
		JP 2803910 B	24-09-1998
		JP 8511808 T	10-12-1996
		NO 954081 A	13-12-1995
		NZ 281260 A	27-05-1998
		US 5728540 A	17-03-1998
WO 9733466 A	18-09-1997	FR 2745974 A	19-09-1997
		AU 2165897 A	01-10-1997
		CA 2221028 A	18-09-1997
		EP 0825811 A	04-03-1998
		JP 11512623 T	02-11-1999
JP 08308582 A	26-11-1996	NONE	
WO 9007712 A	12-07-1990	NONE	
WO 9811439 A	19-03-1998	EP 0925504 A	30-06-1999
CA 2214843 A		NONE	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale N°
PCT / FR 00 / 02057

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

IPC 7 G01N 33/68 G01N 33/564 C07K 14/47 A61K 38/17

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la (CIB)

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

IPC 7 G01N C07K

Documentation consultée au que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électroniques consultées au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

BIOSIS, WPI Data, PAJ, EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS

Catégorie ^o	Identification des documents cités avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	n°. des revendications visées
X	US 5 876 954 A (DOBRANSKY TOMAS ET AL) 2 mars 1999 (02.03.99) colonne 28; revendication 17 & EP 0 667 354 A 16 août 1995 (16.08.95) revendication 5 & WO 95 21859 A cité dans la demande	1-21, 40, 51-62
X	WO 97 33466 A (BIO MERIEUX; RIEGER FRANCOIS (FR); PERRON HERVE (FR); BENJELLOUN N) 18 septembre 1997 (18.09.97) cité dans la demande revendications	1-21, 40, 51-62

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégorie spéciale de documents cités :

"A" document définissant l'état général de la technique, n'étant pas considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour permettre de comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche a été effectivement achevée
30 janvier 2001 (30.01.01)

Date d'expédition du rapport de recherche
08 février 2001 (08.02.01)

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen Brevets
n° de télécopieur

Fonctionnaire autorisé

n° de téléphone

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT / FR 00 / 02057

C. (suite). DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS

Catégorie°	Documents cités avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	n° des revendications visées
X	JP 08 308582 A (KAO CORP) 26 novembre 1996 (26.11.96) le document en entier	23
A	RIEGER F ET AL : "UN FACTEUR GLIOTOXIQUE ET LA SCLEROSE EN PLAQUES GLIOTOXICITY IN MULTIPLE SCLEROSIS" COMPTES RENDUS DES SEANCES DE L'ACADEMIE DES SCIENCES. SERIE III: SCIENCE DE LA VIE, NL, ELSEVIER, AMSTERDAM, Vol. 319, no. 4, 1 avril 1996 (01.04.96), pages 343-350, XP000602023 ISSN: 0764-4469 Abrégé	1-21, 40, 51-62
A	KISILEVSKY R ET AL: "ARRESTING AMYLOIDOSIS IN VIVO USING SMALL-MOLECULE ANIONIC SULPHONATES OR SULPHATES: IMPLICATIONS FOR ALZHEIMER'S DISEASE" NATURE MEDICINE, US, NATURE PUBLISHING, CO, Vol. 1, no. 4, 1 février 1995 (01.02.95), pages 143-148, XP0611547 ISSN: 1078-8956 Le document en entier	1-21, 40, 51-62
A	WO 90 07712 A (BISSENDORE PEPTIDE GMBH) 12 juillet 1990 (12.07.90) page 2	1-21, 40, 51-62
A	WO 98 11439 A (BIO MERIEUX ; PERRON HERVE (FR); MALCUS VOCANSON CARINE (FR); MANDOR) 19 mars 1998 (19.03.98) Le document en entier	1-21, 40, 51-62
A	CA 2 214 843 A (HSC RESEARCH AND DEVELOPMENT LIMITED PARTNERSHIP, CA) 30 avril 1999 (30.04.99) Le document en entier	1-63

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

demande internationale n°
PCT/FR 00/02057

Cadre I Observations – lorsqu'il a été estimé qu certaines revendications n pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☐ Les revendications n^{os} se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
2. ☐ Les revendications n^{os} se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
3. ☐ Les revendications n^{os} sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre II Observations – lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

voir feuille supplémentaire

Après réexamen selon la Règle 40.2(e) PCT,
aucune taxe additionnelle n'est à rembourser.

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☒ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n^{os} 22-39 complet, 1-21 and 40-63 en partie
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n^{os}

Remarque quant à la réserve

- ☒ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/ISA/ 210

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs (groupes d') inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. revendications: 1-21,40,51-62 en partie

Polypeptides perlecans être impliquées dans les méthodes diagnostiques, pronostique, prophylactiques ou thérapeutiques (Par exemple: SEQ ID No 1, 2, 69).

2. revendications: 1-21, 40, 51-63 en partie

Polypeptides précurseur de la protéine plasmatique de liaison de rétinol être impliquées dans les méthodes diagnostiques, pronostique, prophylactiques ou thérapeutiques (Par exemple: SEQ ID No 4, 5, 6, 7, 30, 70).

3. revendications: 22-39 complet; 1-21, 40-63 en partie

Polypeptides précurseur de l'activateur du ganglioside GM2 être impliquées dans les méthodes diagnostiques, pronostique, prophylactiques ou thérapeutiques (Par exemple: SEQ ID No. 8-16, 66-68, 72).

4. revendications: 1-21, 40-44, 46-63 en partie

Polypeptides calgranuline B être impliquées dans les méthodes diagnostiques, pronostique, prophylactiques ou thérapeutiques (Par exemple: SEQ ID No.17-23, 43-52).

5. revendications: 1-21, 40-63 en partie

Polypeptides saposine B être impliquées dans les méthodes diagnostiques, pronostique, prophylactiques ou thérapeutiques (Par exemple: SEQ ID No. 24-29, 53-55).

6. revendication : 64

Utilisation de la lycorine

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR 00/02057

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publicati n	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publicati n
US 5876954 A	02-03-1999	FR 2716198 A AU 701972 B AU 1815295 A CA 2142557 A EP 0667354 A FI 954876 A WO 9521859 A JP 2803910 B JP 8511808 T NO 954081 A NZ 281260 A US 5728540 A	18-08-1995 11-02-1999 29-08-1995 16-08-1995 16-08-1995 13-10-1995 17-08-1995 24-09-1998 10-12-1996 13-12-1995 27-05-1998 17-03-1998
WO 9733466 A	18-09-1997	FR 2745974 A AU 2165897 A CA 2221028 A EP 0825811 A JP 11512623 T	19-09-1997 01-10-1997 18-09-1997 04-03-1998 02-11-1999
JP 08308582 A	26-11-1996	NONE	
WO 9007712 A	12-07-1990	NONE	
WO 9811439 A	19-03-1998	EP 0925504 A	30-06-1999
CA 2214843 A		NONE	